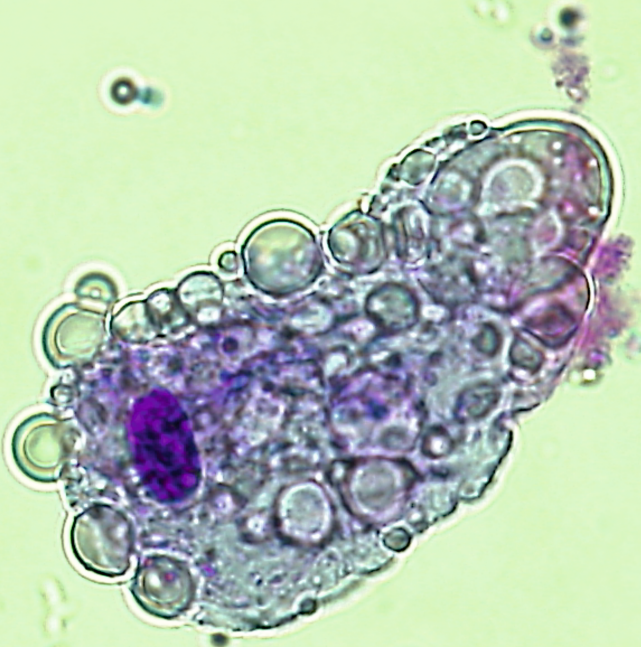


TIM GRIEßL

Taxonomische Untersuchungen des oralen Mikrobioms
und dessen Beeinflussung durch die Ölziehkur mittels
Next-Generation Sequencing und Bioinformatik



INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition wissenschaft
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Taxonomische Untersuchungen des oralen Mikrobioms
und dessen Beeinflussung durch die Ölziehkur mittels
Next-Generation Sequencing und Bioinformatik**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Tim Grießl

aus Frankfurt am Main

Gießen 2018

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. Trinad Chakraborty

Gutachter und Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Eugen Domann

Gutachter: Prof. Dr. med. dent., Prof. h. c. Jörg Meyle

Tag der Disputation: 09.07.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen der oralen Anatomie und Histologie	1
1.1.1	Schleimhaut der Mundhöhle	1
1.1.2	Zunge	1
1.1.3	Kiefer und Zähne	2
1.2	Speichelbildung und Funktion	2
1.2.1	Kleine Speicheldrüsen	2
1.2.2	Große Speicheldrüsen	2
1.2.3	Der Speichel	3
1.3	Das orale Mikrobiom	4
1.3.1	Nutzen der oralen bakteriellen Besiedelung	5
1.4	Zentrale, lokale und systemische Infektionserkrankungen der Mundhöhle ...	6
1.4.1	Biofilm	6
1.4.2	Karies	6
1.4.3	Parodontalerkrankungen	7
1.4.4	Karies und Parodontitis als beeinflussender Faktor systemischer Erkrankungen	9
1.5	Hygiene und Präventionsmaßnahmen	10
1.6	Aktuelle Erkenntnisse zum Ölziehen	11
1.7	Risiken des Ölziehens	14
1.8	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Untersuchung von Humanpräparaten	15
2.2	Charakterisierung des Probandenkollektivs	15
2.3	Sicherheitsmaßnahmen und Sterilitätsbedingungen	16
2.4	Kultur- und Nährmedien	16
2.5	Ausplattieren	17
2.6	Verdünnungsreihe	17
2.7	Verdünnungsausstrich	17
2.8	Bakterienstämme, Mock-Community und Übernachtkulturen	18
2.9	Chemikalien	19
2.10	Verbrauchsmaterialien	20
2.11	Geräte	20
2.12	Software und Datenbanken (Bioinformatik)	21
2.13	Laborspezifische Begriffe	22
2.14	Probengewinnung	23
2.14.1	Zyklischer Aufbau des Hauptversuchs	24
2.14.2	Dokumentation und Verarbeitung des Probenmaterials	24
2.15	Positiv- und Negativkontrollen	25
2.16	DNA Extraktionsmethoden	26
2.16.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	26
2.16.2	DNA-Extraktion mit dem Invitrogen™ PureLink Kit	27
2.16.3	Lysieren der Pellets mit dem MO BIO® PowerLyzer Kit	28
2.17	DNA-Messverfahren	29
2.18	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.18.1	Materialien für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32

2.18.2	Amplikon-I PCR V4-Region	33
2.18.3	Amplikon-I PCR V3–V4-Region	34
2.18.4	Amplikon-II PCR V3–V4/V4-Region ohne Mastermix.....	35
2.19	Auftrag der PCR-Produkte auf ein 1 %iges Agarose-Gel	36
2.19.1	Ansatz der Ladder (1 kb DNA-Marker) 1000 bp.....	36
2.19.2	Ansatz des 10x TBE (Tris-Borat-EDTA) Puffers.....	37
2.20	MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	37
2.21	Färbemethoden für die Mikroskopie.....	37
2.22	Aufreinigung der Amplikon PCR-Produkte mittels Agencourt AMPure XP®	38
2.22.1	Erste AMPure-Aufreinigung	38
2.22.2	Zweite AMPure-Aufreinigung	39
2.23	Next-Generation Sequencing (NGS) mit dem Illumina® MiSeq™	39
2.23.1	Vorbereitungen zur Sequenzierung mit dem Illumina® MiSeq™	40
2.23.2	Aufbau des MiSeq™ NGS-Systems.....	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Identifikation der isolierten Bakterien auf COLS, MacConkey- und SAB-Agar mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	44
3.1.1	Vergleich NaCl- und Ölziehprobe auf SAB-Agar.....	46
3.1.2	Vergleich NaCl- und Ölziehprobe auf MacConkey-Agar	47
3.1.3	Vorversuche zur DNA-Extraktion aus Öl.....	48
3.1.4	PCR mit den DNA-Produkten aus der Phenol-Chloroform-Extraktion:	49
3.1.5	DNA-Extraktion aus Öl-Pellets.....	49
3.1.6	DNA-Extraktion aus einer Ölziehprobe	50
3.1.7	Mikroskopie	53
3.2	Ergebnisse, Kultivierung (Hauptversuch)	55
3.2.1	CFU/Gesamtvolumen: Mittelwert aus 3 Tagen, Vergleich vorher/nachher mit NaCl (0,9 %) und Öl	56
3.2.2	CFU/ml Probe: Vergleich vorher/nachher mit NaCl (0,9 %) und Öl.....	57
3.2.3	Darstellung der CFU-Reduktion in Prozent, bezogen auf die Vorher-werte (100 %).....	58
3.2.4	Absoluter CFU-Wert aus den Gemischen NaCl-Speichel und Öl-Speichel	59
3.2.5	Absoluter CFU-Wert aus den Gemischen NaCl-Speichel und Öl-Speichel pro ml Speichel.....	60
3.2.6	Speichelvolumen in Ziehproben: Vergleich der Probanden an drei Tagen mit NaCl (0,9 %) und Öl	61
3.3	Sequenziergebnisse	62
3.3.1	Darstellung der Problematik von verschiedenen Regionen der 16S rDNA und Datenbanken	62
3.3.2	Bakterielle Zusammensetzung von NaCl (0,9 %) und Öl mit der Mock- Community	63
3.3.3	Bakterielle DNA aus den Negativkontrollen, n = 3 je Säule.....	64
3.3.4	Anzahl der Reads aus den Negativkontrollen, summiert aus je drei Proben, Vergleich der Medien je Analyse	65
3.3.5	Individuelle Mikrobiome der Probanden nach Gattungen.....	66
3.3.6	Individuelle Mikrobiome der Probanden nach (bakterieller) Sauerstofftoleranz	67
3.3.7	Individuelle Mikrobiome der Probanden nach Gramverhalten	68

3.3.8	Bakterielle Zusammensetzung der Medien: Speichel, NaCl (0,9 %), Öl summiert aus je drei Proben, Vergleich der Probanden	69
3.3.9	Sauerstofftoleranz der bakteriellen Zusammensetzung der Medien: Speichel, NaCl (0,9 %) und Öl, summiert aus je drei Proben, Vergleich der Medien je Proband	70
3.3.10	Gramverhalten der bakteriellen Zusammensetzung der Medien: Speichel, NaCl (0,9 %) und Öl, summiert aus drei Proben, Vergleich der Medien je Proband.....	71
3.3.11	Visualisierung der Unterschiede der oralen Mikrobiome	72
3.3.12	Vergleich: CFU und Reads pro Speichelvolumen im zeitlichen Verlauf.....	73
3.3.13	Reads erzielt aus den Ziehproben: Mittelwert aus je drei Tagen, Vergleich der Probanden mit NaCl (0,9 %) und Öl	74
4	Diskussion.....	75
4.1	Diskussion der Methodik	75
4.1.1	Vergleich der Methoden anderer Autoren	75
4.1.2	Vergleich verschiedener Öle.....	76
4.1.3	Vergleich verschiedener Ölziehvolumina	76
4.1.4	Diskussion der technischen und bioinformatischen Methodik	76
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	79
4.2.1	Vergleich der Ergebnisse anderer Autoren	79
4.2.2	Vergleich der Effektivität des Ölziehens mit den Ergebnissen anderer Autoren.....	80
4.2.3	Eruierung möglicher Risiken des Ölziehens.....	84
4.3	Schlussfolgerungen	85
5	Zusammenfassung und Ausblick	86
6	Summary	88
7	Abkürzungsverzeichnis.....	89
8	Tabellenverzeichnis.....	90
9	Abbildungsverzeichnis.....	91
10	Literaturverzeichnis.....	93
11	Publikationsverzeichnis	98
12	Anhang	99
13	Erklärung zur Dissertation	103
14	Danksagung	104

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der oralen Anatomie und Histologie

Als Eingang in das digestive und respiratorische System ist die Mundhöhle (*Cavitas oris*) speziellen äußeren und inneren Einflüssen ausgesetzt. Sie dient der Aufnahme von Nahrung, deren Zerkleinerung und Geschmackswahrnehmung, der Vorverdauung, der Mundatmung sowie der Lautbildung. Begrenzt wird die Mundhöhle von ventral durch die Lippen (*Labiae oris*), von lateral durch die Wangen (*Buccae*), nach kaudal durch den Mundboden (*Diaphragma oris*), nach kranial durch den harten und weichen Gaumen (*Palatum durum et molle*) sowie nach dorsal durch die vorderen Gaumenbögen (*Arcus palatoglossus*). Die sensible Innervation obliegt im Wesentlichen dem zweiten und dritten Ast des *Nervus trigeminus* (*Nervus maxillaris/Nervus mandibularis*). Die Blutversorgung ist durch die *Arteria carotis externa* gewährleistet. Venöses Blut drainiert in die *Vena jugularis interna et externa* sowie die Lymphe in die regionalen Halslymphknoten (Drenckhahn *et al.* 2004; Benninghoff *et al.* 2008).

1.1.1 Schleimhaut der Mundhöhle

Die orale *Mucosa* wird durch ein mehrschichtiges, teilweise verhorntes Plattenepithel gebildet. Wie auch auf normaler Felderhaut sind Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen anzutreffen. In der *Lamina propria* befinden sich überwiegend muköse Drüsen sowie Meißner-Tastkörperchen. Die Regenerationszeit des Epithels beträgt lediglich 12 Tage. Je nach Lokalisation (Lippe, Zunge, Gaumen, gingivaler Sulcus) kann es regionale Unterschiede in Aufbau und Funktion der *Mucosa* geben (Welsch und Deller 2010).

1.1.2 Zunge

Die Zunge (*Lingua*) ist ein durch Muskeln gebildetes Organ, welches zur Geschmackswahrnehmung, Lautbildung, Mimik und Immunabwehr dient. Sie ist von verschiedenen Papillen (*Papillae filiformes, fungiformes et foliatae*) bedeckt, welche ihre Oberfläche vergrößern, weshalb sie reichhaltig von Bakterien besiedelt ist. Eine Teilverhornung (Parakeratinisierung) kann diesen Effekt noch verstärken, zu Entzündungen führen oder die Ansiedlung von *Candida albicans* begünstigen. Die Zunge enthält zusätzlich an ihrer Oberfläche zahlreiche kleine Speicheldrüsen (Aumüller 2007; Benninghoff *et al.* 2008).

1.1.3 Kiefer und Zähne

Die Kiefer des Menschen (*Maxilla* und *Mandibula*) sowie die Kaumuskulatur entspringen embryologisch aus dem ersten Kiemenbogen (Mandibularbogen). Das gesamte Korrelat aus diesem Kiemenbogen ist daher einem einzigen innervierenden Nerv (*Nervus trigeminus*) zuzuordnen (Benninghoff *et al.* 2008).

Die Zähne entstehen embryologisch aus dem Ektomesenchym. Sie sind in die Kiefer eingebettet und mit dem Alveolarknochen (zahntragender Anteil der Kiefer) über Kollagenfasern (Sharpeysche Fasern) verbunden. Sie bestehen morphologisch aus Krone und Wurzel bzw. histologisch aus Zahnschmelz, Dentin, Wurzelzement und der Pulpa. Man unterscheidet zwischen erster (Anzahl: 20) und zweiter Zahngeneration (Anzahl: 32), wobei die erste Generation (Milchzähne) im Laufe der Kindheit allmählich durch die zweite Generation resorbiert, ersetzt bzw. erweitert wird. Der Zahnschmelz ist dabei die härteste Substanz im Körper und besteht zu 95 Gewichtsprozent aus anorganischen Calcium- und Phosphatverbindungen (Apatit). Sowohl der Zahnschmelz wie auch das Wurzelzement (gingivaler Sulcus) spielen bei der Besiedelung durch Plaquebakterien und den damit verbundenen Krankheitsbildern wie der Karies und Parodontitis eine wesentliche Rolle (Welsch und Deller 2010).

1.2 Speichelbildung und Funktion

Die Speicheldrüsen (*Glandulae salivariae*) dienen als exokrine Drüsen der Speichelproduktion. Man unterscheidet kleine und große Speicheldrüsen (*Glandulae salivariae minores et majores*). Die Speichelproduktion wird über die sympatische und parasympatische Innervation des *Nervus glossopharyngeus* (*Glandula Parotis*) bzw. des *Nervus facialis* (*Glandula submandibularis et sublingualis*) gesteuert (Benninghoff *et al.* 2008).

1.2.1 Kleine Speicheldrüsen

Die kleinen Speicheldrüsen liegen in der *Mucosa*, der Mundhöhle, verteilt und produzieren entsprechend ihrer Lokalisation rein serösen bis rein mukösen Speichel. Dabei produzieren die Spüldrüsen der Geschmackspapillen ein rein seröses Sekret, die Drüsen der Lippen-/Wangenregion ein seromuköses Sekret und die Drüsen der Gaumen-/Rachenregion ein rein muköses Sekret (Welsch und Deller 2010).

1.2.2 Große Speicheldrüsen

Es existieren je drei paarige, große Speicheldrüsen, die ebenfalls serösen bis mukösen Speichel produzieren. Das Drüsengewebe ist in Läppchen gegliedert, von

Bindegewebe durchzogen und besitzt ein komplexes Ausführungsgangsystem zur Mundhöhle. Als vorherrschende Drüse ist die *Glandula parotis* rein azinär (seröses Sekret), die *Glandula submandibularis* gemischt azinotubulär (serömuköses Sekret) und die *Glandula sublingualis* gemischt tubuloazinär (mukoseröses Sekret) (Welsch und Deller 2010).

1.2.3 Der Speichel

Die Aufgaben des Speichels sind im Wesentlichen die Vorverdauung (α -Amylase) und Erleichterung des Weitertransports des Speisebolus, Abwehr- und Spülfunktion sowie die Remineralisierung zum Schutz der Zähne. Die von den Speicheldrüsen produzierte Menge an Speichel beträgt zwischen 0,5 und 1,5 l/Tag. Die Speichelfließrate liegt bei 1–10 ml/min, wobei der Ruhespeichel zu über 50 % von der *Glandula submandibularis* und stimulierter Speichel zu über 50 % von der *Glandula parotis* gebildet und sezerniert wird. Somit ist der stimulierte Speichel deutlich weniger mukös und erheblich geringer viskös als Ruhespeichel (Benninghoff *et al.* 2008). Der Speichel besteht aus:

- 99 % Wasser
- 0,7 % Proteine: Enzyme, Muzine, Immunglobuline (IgA, IgG, IgM) und Wachstumsfaktoren (EGF, NGF)
- 10–400 Millionen bakterielle Keime/ml

(Benninghoff *et al.* 2008)

Anorganische Bestandteile sind: Calcium, Phosphat, Kalium, Chlorid, Magnesium und Hydrogenkarbonat.

Weitere Bestandteile sind: Kohlenhydrate, Lipide, Vitamine, zyklische Nukleotide, Harnstoff, Ammoniak, Kreatinin sowie Kortikosteroide (Hellwig *et al.* 2013).

Die genaue Zusammensetzung ist abhängig von der Sekretionsrate, Dauer und Stimulationsgrad der produzierenden Drüse sowie von diätetischen Einflüssen (Hellwig *et al.* 2013).

Der pH-Wert des vorwiegend hypoosmotischen Sekundärspeichels (sezernierter Speichel) liegt bei 6,5–6,9 wobei zwei wesentliche Puffersysteme (Bikarbonat- und Phosphatpuffer) vorhanden sind (Hellwig *et al.* 2013).

Den im Speichel enthaltenen Proteinen Lysozym, Laktoferrin, Peroxidase, Defensine und Histatine werden antimikrobielle sowie dem Cystatin antivirale Eigenschaften

zugeschrieben. Sekretorische Immunglobuline wie das IgA, inhibieren die Adhäsion von Mikroorganismen und IgG bzw. IgM steigern die Phagozytose dieser. Das aus dem Lactoperoxidase-Thiocyanat-Wasserstoffperoxid-System resultierende Hypothiocyanat wirkt ebenfalls antibakteriell (Hellwig *et al.* 2013).

Bis zum Eintritt in die Mundhöhle ist der Speichel (parotider Speichel) steril (Schroder *et al.* 2017).

1.3 Das orale Mikrobiom

Das orale Mikrobiom umfasst das gesamte bakterielle Konsortium der in der Mundhöhle vorhandenen Mikroorganismen. Dabei ist das orale Mikrobiom wesentlicher Bestandteil des humanen Gesamtmikrobioms (Segata *et al.* 2012b). Historisch wurde die Möglichkeit und Methode zur humanen DNA-Extraktion aus Speichel erstmals 2006 von Quinque *et al.* beschrieben. Dabei stellte sich heraus, dass die extrahierte DNA zu einem erheblichen Anteil bakteriellen Ursprungs war.

Die weltweit erste Studie zur Untersuchung der Vielfalt des oralen Mikrobioms gesunder Menschen wurde 2009 von Nasidze *et al.* durchgeführt. Dabei wurden die oralen Mikrobiome von 120 Personen, die nicht miteinander verwandt waren (je 10 Probanden aus 12 verschiedenen Regionen der Erde), auf ihre Unterschiede mittels 16S rDNA-Sequenzierung hin untersucht. Es wurden 101 verschiedene Gattungen von Bakterien gefunden, wobei 80 % der Sequenzen aller Probanden auf 10 Gattungen beruhten. Die zentrale Aussage dieser Studie war jedoch, dass die oralen Mikrobiome sich umso mehr voneinander unterscheiden, je weiter entfernt die Probanden voneinander leben (Ernährung und Alter wurden nicht betrachtet).

Die dabei verwendete und heute weiterentwickelte Methode der 16S rDNA-Sequenzierung basiert auf der Identifizierung von Bakterien anhand ihrer unterschiedlichen Nukleotidabfolge des 16S rDNA-Gens, welches für die 16S rRNA codiert. Dieses besteht aus neun variablen Regionen (V1-V9), von welchen jedes Bakterium eine individuelle Basenabfolge (Taxonomie) besitzt und so sicher mittels Sequenzierung (Detektion der Basenabfolge) und bioinformatischen Analysen bzw. Abgleichen von Datenbanken bestimmt werden kann (Yarza *et al.* 2014).

Bis heute wurden in der Mundhöhle rund 1.000 verschiedene bakterielle Spezies gefunden (Dewhirst *et al.* 2010). Dabei scheint die Mundhöhle nach dem Darm das am reichhaltigsten mit Bakterien besiedelte Habitat des menschlichen Körpers zu sein (Segata *et al.* 2012b) – zuzüglich der Archaeen als Prokaryoten. Es konnten innerhalb der Mundhöhle Zonen unterschiedlicher bakterieller Besiedelung nachgewiesen

werden, wobei der Speichel die gleiche Keimzusammensetzung wie *Gingiva*, *Mucosa* und harter Gaumen hat. Unterschiede liegen im Bereich der Tonsillen, Rachen, Zunge sowie zu supra- und subgingivaler Plaque (Segata *et al.* 2012a). Die Sequenzen aller Mikroorganismen werden unter anderem in einer speziellen Datenbank, der HOMD (Humane Oral Microbiome Database), zusammengefasst und archiviert.

Die in der Mundhöhle vorkommenden Viren sind in Anbetracht der massiven bakteriellen Besiedelung Bakteriophagen (Pride *et al.* 2012). Im Speichel können auch humanspezialisierte Viren gefunden werden, die dann jedoch meist einen Pathogenitätswert besitzen, wie z. B. das *Herpes-simplex*-Virus (Kaufman *et al.* 2005).

Eine 2010 veröffentlichte Studie zur oralen Pilzbesiedelung (Mykobiom) (Ghannoum *et al.* 2010) fand in einer Gruppe aus 20 gesunden Individuen insgesamt 74 kultivierbare und 11 nichtkultivierbare Genera von Pilzen. Dabei waren bei 75 % der Probanden *Candida albicans* nachzuweisen, gefolgt von *Cladosporium* (65 %). Die Autoren halten jedoch Kontaminationen durch Nahrungsmittel und Sporen aus der Luft, die nicht zur Besiedelung des oralen Habitats beitragen, für wahrscheinlich. Es ist davon auszugehen, dass zumindest *Candida albicans* bei der Hälfte aller Menschen, mit steigendem Alter zunehmend, dem oralen Mykobiom zuzurechnen ist, aus welchem akute und chronische Pilzinfektionen (*Candidiasis*) resultieren können (Arendorf und Walker 1979).

1.3.1 Nutzen der oralen bakteriellen Besiedelung

Die Kommensalkkeime der Haut, des Darms, des Oropharynx und der Mundhöhle haben mannigfaltige Aufgaben für den Gesamtorganismus. So kann alleine die Anwesenheit der Kommensalkkeime die Ansiedelung und Infektion durch pathogene Erreger erschweren oder verhindern (Vollaard und Clasener 1994). Wird die Balance der bakteriellen Mikroflora durch Immunschwäche oder den Einsatz von Antibiotika verschoben, können opportunistische Infektionserkrankungen, wie eine *Candida albicans*- oder *Staphylococcus-aureus*-Infektion, resultieren (Sullivan *et al.* 2001). Heutige Untersuchungen zum humanen Gesamtmikrobiom gehen davon aus, dass auf jede Körperzelle quantitativ auch eine bakterielle Zelle kommt und dass diese in Summe eine entscheidende Wechselwirkung mit dem Gesamtorganismus eingehen. So sind 90 % der vorhandenen Bakterien einer normalen Besiedelung (physiologisches Gesamtmikrobiom) zuzuschreiben (Sender *et al.* 2016). Schlussfolgernd spielt auch das orale Mikrobiom für Gesundheit und Krankheit eine entscheidende Rolle.

1.4 Zentrale, lokale und systemische Infektionserkrankungen der Mundhöhle

1.4.1 Biofilm

Die dentale Biofilmbildung liegt primär dem Pellicle (*Cuticula dentis*), welches aus Proteinen des Speichels besteht und elektrostatisch an dem negativ geladenen Zahnschmelz anhaftet, zugrunde. Der 0,1–1 µm dicken Matrix heften sich Frühbesiedeler wie *Streptococcus mitis*, *S. salivarius*, *S. oralis* (grampositive Kokken) sowie Aktinomyzeten nach wenigen Stunden an. Zwischen dem 7. und 14. Tag überwiegen dann Stäbchen und filamentöse Bakterien. In die Biofilmmatrix akkumulieren fortschreitend pathogene Spätbesiedeler wie *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* oder *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* wobei die Frühbesiedeler nicht mit den Spätbesiedelern koaggregieren. Die Schlüsselrolle zur Connection von Früh- und Spätbesiedelern wird *Fusobacterium nucleatum* als zentralem Brückenbakterium zugeschrieben (J. J. Zambon et al 1997). Entsprechend ihrer Lokalisation (Sauerstoffangebot) variiert die bakterielle Zusammensetzung des Biofilms, wobei 60–70 % seines Volumens aus Proteinen, Polysacchariden, Nukleinsäuren und Lipiden besteht. Diese Matrix schützt die Bakterien vor Antikörpern, bakteriolytischen Enzymen oder Antibiotika. Im Speichel enthaltenes Calcium und Phosphat kann den Biofilm mineralisieren und zur Bildung von Zahnstein führen (Hellwig et al. 2013).

1.4.2 Karies

Die Karies gehört zu den häufigsten chronischen Erkrankungen. Von 4.600 untersuchten Probanden haben in Deutschland Kinder von 12 Jahren einen DMFT- (Decayed/Missing/Filled, Teeth) Wert von 0,5 (maximal 28), Erwachsene zwischen 35 und 44 Jahren einen DMFT-Wert von 11,2 sowie 65–74-Jährige einen Wert von 17,7. Damit ist die Karies heute immer noch die häufigste Ursache für Zahnverlust (Jordan et al. 2014).

Bereits 1890 beschrieb Willoughby Dayton Miller in seiner Veröffentlichung „The Microorganisms of the Human Mouth“ die Pathogenese der Karies. Diese resultiert aus der bakteriellen Besiedelung der Zahn- oder Zahnwurzeloberfläche und der Etablierung eines bakteriellen Biofilms. Bei Kohlenhydratzufuhr beginnen Milchsäurebakterien wie *S. mutans* sowie *Lactobacillus* und *Actinomyces* diese über die Glykolyse zu verstoffwechseln. Die so lokal gebildeten sauren Endprodukte Laktat und Pyruvat verursachen eine Demineralisation (Herauslösen von Calcium und Phosphat) der Zahnoberfläche. Wird der Biofilm nicht mechanisch entfernt und die Zahnoberfläche

über den Speichel remineralisiert resultieren Kavitäten. Bakterien können so in den Zahn bzw. in den Alveolarknochen penetrieren und Infektionen verursachen (Hellwig *et al.* 2013).

König KG *et al.* ergänzen 1971 die Pathogenese der Karies auf der Basis von vier Grundvoraussetzungen: Wirtsorganismus, Mikroorganismen, Substrat für die Mikroorganismen sowie die notwendige Zeit.

1.4.3 Parodontalerkrankungen

1.4.3.1 Gingivitis

Die Gingivitis ist eine entzündliche, reversible, meist Biofilm-assoziierte Reaktion der Gingiva. Page und Schroeder teilen die Gingivitis in initiale, frühe und etablierte Läsion ein. Die initiale Läsion entwickelt sich bei vorhandenem Biofilm innerhalb weniger Tage und führt zur entzündlichen Reaktion des Gefäßplexus unterhalb des Saumepithels. Die Sulcusflüssigkeitsfließrate wird hochreguliert. Neutrophile Granulozyten und Serumproteine (vor allem Fibrin) kommen vermehrt im gingivalen Sulcus vor. Das perivaskuläre Kollagen wird abgebaut, was zu einer Auflockerung des koronalen Saumepithels führt (Page und Schroeder 1976; Hellwig *et al.* 2013).

Wird der Biofilm nicht entfernt, entwickelt sich innerhalb von 14 Tagen die frühe Läsion. Histologische Unterschiede zur initialen Läsion sind die vermehrte Ansammlung von Lymphozyten und Makrophagen sowie die beginnende Proliferation des Saumepithels nach lateral. Es kommt zum weiteren dentogingivalen Kollagenverlust und zu zytophagischen Veränderungen der Fibroblasten. (Page und Schroeder 1976; Hellwig *et al.* 2013)

Die etablierte Läsion folgt innerhalb weniger Wochen auf die frühe Läsion und unterscheidet sich zu ihr durch die Dominanz der B-Lymphozyten und dem Vorhandensein von extravaskulären Immunglobulinen im Bindegewebe und Saumepithel. Die fortschreitende Entzündung führt zur weiteren Auflösung des gingivalen Stützgewebes und apikal/lateral gerichteten Proliferation des Saumepithels. Bis zu diesem Stadium ist die Gingivitis vollständig reversibel, wenn der Biofilm entfernt und das Immunsystem herunterreguliert wird. Diese etablierte Läsion kann jedoch auch in eine fortgeschrittene Läsion (Parodontitis) übergehen (Page und Schroeder 1976; Hellwig *et al.* 2013).

1.4.3.2 Parodontitis

Die Parodontitis ist die häufigste chronische inflammatorische Erkrankung. 52 % der 35–44-Jährigen, 65 % der 65–74-Jährigen und 90 % der über 75-jährigen Personen weisen in Deutschland nach der aktuellen fünften Mundgesundheitsstudie eine Parodontitis auf. Ein positiver Effekt von präventiven Maßnahmen auf die Auswirkung und Schwere sowie die Notwendigkeit zur demografischen Reduktion der Parodontitis wird beschrieben (Jordan *et al.* 2014). Der Parodontitis liegen stets ein vorhandener dentaler Biofilm im parodontalen Sulcus und das sich damit auseinandersetzende Immunsystem zu Grunde. Sie ist multifaktoriell und wird durch verschiedene lokale und systemische Parameter beeinflusst. Page und Kornman beschreiben in ihrer Theorie zur Pathogenese entzündlicher Parodontalerkrankungen ein Zusammenspiel des Biofilms, der Entzündungs- und Immunantwort des Wirts sowie des Knochen- und Bindegewebsmetabolismus. Zusätzlich korreliert die Parodontitis mit genetischen und erworbenen Risikofaktoren, wobei die Art und Weise, wie das Immunsystem auf die Entzündung reagiert, das Krankheitsbild maßgeblich charakterisiert. Es kann die Bildung von Zytokinen, Prostaglandinen sowie Matrix-Metalloproteinasen und einen damit einhergehenden gehemmten Knochenmetabolismus hervorrufen, wobei das Komplementsystem, das zelluläre und nicht zelluläre Immunsystem, koagieren (Page und Kornman 1997). Die Virulenz der im Biofilm enthaltenen pathogenen Erreger ist ein weiterer entscheidender Faktor zur Progression der Parodontitis (spezifische Plaquehypothese von Robert Koch 1882). Als qualitativ besonders pathogene Erreger werden folgende anaerobe, gramnegative Bakterien beschrieben:

Tabelle 1: Parodontitis-assoziierte Keime (Baron 1996; Dashper *et al.* 2011; (Fine *et al.* 2007)

Gattung	Spezies	Morphologie	Bedeutende Virulenzfaktoren
<i>Aggregatibacter</i>	<i>actinomycetem-comitans</i>	Stäbchen	Leukotoxin A Lipopolysaccharide
<i>Porphyromonas</i>	<i>gingivalis</i>	Stäbchen	Gingipaine Lipopolysaccharide Fimbrien
<i>Tannerella</i>	<i>forsythia</i>	Stäbchen	Trypsin like- / PrtH- Proteasen BspA-Protein Glycosidase S-Layer
<i>Treponema</i>	<i>denticola</i>	Spirochät	Leucinreiche Proteine, Schwefelwasserstoffe

Der Krankheitsverlauf gliedert sich progredient in initiale, frühe, etablierte und fortgeschrittene Läsion, wobei die fortgeschrittene Läsion die manifeste Parodontitis charakterisiert (Page und Schroeder 1976). Sie ist nicht vollständig reversibel und durch einen destruktiven Prozess des Zahnhalteapparates gekennzeichnet. Chronische und akute Entzündungsstadien können fließend ineinander übergehen. Die Kennzeichen sind: entzündliche Gewebereaktion (vor allem durch Plasmazellen), ausgedehnter Knochenabbau, anhaltender Kollagenverlust sowie die Umwandlung von Knochen und Desmodont in fibröses Bindegewebe. Diese Prozesse begünstigen im Verlauf die Bildung einer parodontalen Tasche. Weiterhin etablieren sich Infektionen und Abszesse, die zum Zahnverlust oder systemischen Komplikationen führen können (Page und Schroeder 1976; Hellwig *et al.* 2013). Klinisch wird die Parodontitis in folgende Formen eingeteilt. Sie können lokal oder generalisiert vorkommen:

- Chronische Parodontitis
- Aggressive Parodontitis
- Parodontitis als Manifestation einer systemischen Erkrankung
- Nekrotisierende Parodontalerkrankungen
- Abszesse des Parodonts
- Para-Endo-Läsionen (Hellwig *et al.* 2013)

1.4.4 Karies und Parodontitis als beeinflussender Faktor systemischer Erkrankungen

Eine profunde Karies oder fortgeschrittene Parodontitis kann zu einer systemischen Bakteriämie führen, bei welcher vor allem die *Viridans-Streptokokken* in der Lage sind, eine lebensbedrohliche Endokarditis *acuta/lenta* zu verursachen (Knox und Hunter 1991).

Auch können dentoalveoläre Abszesse, die meist einer tiefen kariösen Läsion zugrunde liegen, heute noch letale Ausmaße in Form einer *Angina Ludovici* annehmen (Baron 1996). Die Größe und Art des Abszesses korreliert dabei mit der Anzahl und Varietät der Erreger, die im *Pus* (Eiter) gefunden werden. Aus dominanten Abszessen mit Ausbreitungstendenz konnten sechs oder mehr Keime isoliert werden. Dabei handelt es sich um Anaerobier aus der Mundhöhle, welche einen Weg in den Kieferknochen finden, was meist auf einer kariösen Läsion basiert. Der Grund dieser

erhöhten Pathogenität ist die mikrobielle Gemeinschaft (Konsortium) der Erreger, welche eine erhöhte proteolytische Aktivität besitzen (Marsh und Martin 2003).

Die Parodontitis und Diabetes mellitus können sich gegenseitig sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Die durch die bakterielle Infektion (Lipopolysaccharide) vermehrt gebildeten Zytokine sollen in der Lage sein, die AGEs (Advanced Glycation Endproducts) hoch zu regulieren, welche entscheidend für das metabolische Ausmaß des Diabetes mitverantwortlich sind (Grossi und Genco 1998). Zusätzlich ist bei einem entgleisenden Diabetes mellitus die Wundheilung und damit die körpereigene Reaktion auf die Parodontitis erheblich gehemmt (Guo und Dipietro 2010). Weiterführend nimmt die Parodontitis auch einen maßgeblichen Einfluss auf Art und Ausmaß des metabolischen Syndroms (Furuta *et al.* 2016).

Eine 1996 veröffentlichte Studie mit 124 schwangeren Frauen konnte statistisch zeigen, dass Parodontalerkrankungen einen signifikanten Risikofaktor für ein geringeres Geburtsgewicht der entbundenen Kinder im Vergleich zu jenen gesunder Mütter darstellen (Offenbacher *et al.* 1996).

Parodontalkeime wie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* wurden auch in arteriosklerotischen Plaques gefunden (J. J. Zambon *et al.* 1997). Damit existiert eine Korrelation zwischen der Parodontitis und kardio-vaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose und den damit verbundenen Krankheitsbildern des Myokardinfarkts oder Schlaganfalls (Kinane 1998). Zudem konnten Parodontitis assoziierte Keime auch bei bronchoalveolären Lavagen von Pneumoniepatienten als vermeintlich auslösender Faktor nachgewiesen werden (Imsand *et al.* 2002).

Salazar *et al.* beschrieben 2013 eine Assoziation zwischen der weltweit vierthäufigsten Krebserkrankung, dem Magenkarzinom und oraler bzw. parodontalpathogener Bakterien. Dabei steigt das Risiko, an oben beschriebener präkanzerösen Vorstufe zu erkranken, bei manifester Parodontitis signifikant an (Salazar *et al.* 2013).

1.5 Hygiene und Präventionsmaßnahmen

Zur Reduktion der oralen bakteriellen Last werden mechanische und chemische Methoden eingesetzt. Da orale Bakterien zur Biofilmbildung auf der Zahnoberfläche neigen und dieser die bakteriellen Zellen vor exogenen Einflüssen schützt, ist die mechanische Plaqueentfernung mittels Zahnbürste und Zahnseide eine wichtige Grundvoraussetzung für die orale Gesundheit (Hellwig *et al.* 2013). Unterstützende Mittel sind Zahnpasta, welche meist unter anderem Schleifmittel und Fluoride enthält, sowie Mundwasser zur Keimreduktion (Hellwig *et al.* 2013). Jedoch wird die orale

mikrobielle Zusammensetzung auch von anderen Faktoren wie beispielsweise der Ernährung beeinflusst (Nasidze *et al.* 2009).

Handelsübliche Zahnpasten enthalten bis zu 1.500 ppm Fluoridverbindungen wie Aminfluorid, Calciumfluorid, Natriumfluorid oder Zinnfluorid. Diese werden auch in Mundwässern eingesetzt. Die Fluoride haben nicht nur remineralisierende Effekte auf die Zahnhartsubstanz (Hellwig *et al.* 2013), sondern auch antimikrobielle Eigenschaften. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Fluoride wichtige Enzyme der anaeroben Glykolyse von Mikroorganismen, wie etwa der Enolase, hemmen, was besonders *Streptococcus* und *Lactobacillus* in ihrem Stoffwechseln beeinträchtigen kann (Qin *et al.* 2006). Auch wird Fluorid besonders bei niedrigem extrazellulären pH-Wert in die Bakterienzelle aufgenommen und dissoziiert dabei zu H^+ und F^- , was zu einer Übersäuerung der Zelle führt (Qin *et al.* 2006).

Mundwässer sollen die orale bakterielle Last chemisch reduzieren. Dabei können sie bis zu 40 % Alkohol enthalten. Die antimikrobielle Wirkung von Ethanol ist hinreichend bekannt, jedoch bei der Anwendung für Kinder und alkoholabhängigen Personen als höchst kritisch zu bewerten. Zudem wird des Öfteren Chlorhexidin zugesetzt, welches ebenfalls gute antimikrobielle Eigenschaften besitzt (Loe *et al.* 1972). Zur Reduktion der Gingivitis wurden derzeit auch nitrathaltige Säfte in klinischen Studien mit positivem Resultat – trotz möglicher Risiken und Nebenwirkungen für den Gesamtorganismus – untersucht (Jockel-Schneider *et al.* 2016).

1.6 Aktuelle Erkenntnisse zum Ölziehen

Das Prozedere des Ölziehens beschreibt ein Volumen von einem Esslöffel für Erwachsene und einem Teelöffel für Kinder ab 5 Jahren. Das Öl wird für bis zu 20 min oral von Seite zu Seite durch die Zahnreihen gezogen (Shanbhag 2017). Es entsteht eine Emulsion, die nach dem Ziehen ausgespuckt und aufgrund der hohen bakteriellen Konzentration nicht verschluckt werden sollte. Anschließend müssen Ölrückstände mit einer Wasserspülung oder normalem Zähneputzen eliminiert werden. Das Ölziehen sollte dabei morgens auf leeren Magen durchgeführt werden. Die Theorie dahinter behauptet, dass pflanzliche Öle Bakterien und ihre Toxine binden und aus der Mundhöhle entfernen können (Peedikayil *et al.* 2015; Sroisiri Theweeboon *et al.* 2011; Anand T.D. *et al.* 2008).

Darauf basierend untersuchte eine Studie die Reduktion des *Foetor ex ore* von Sesamölziehen im Vergleich zu Chlorhexidin. Das Ergebnis konstatierte eine gleich hohe Effektivität (Reduktion des *Foetor ex ore* und dessen verursachenden

Mikroorganismen) des Sesamöls im Vergleich zur Positivkontrolle mit Chlorhexidin (Sood *et al.* 2014).

Peedikayil *et al.* beobachteten in vier Studien mit insgesamt 60 Probanden im Alter zwischen 16 und 18 Jahren eine signifikante Reduktion der Gingivitis im Zusammenhang mit Kokosölziehen. Dabei reduzierte sich der modifizierte Gingival- und Plaqueindex zwischen Woche eins bis vier stetig um bis zu 50 % und erreichte damit das gleiche Niveau der Positivkontrollen mit Chlorhexidin (Peedikayil *et al.* 2015). Auch Asokan *et al.* führten 2009 eine ähnliche Studie zur Reduktion der Gingivitis mittels Sesamölziehen bei 20 Teilnehmern (jugendlichen Männern) durch. Nach einem Zeitraum von 10 Aktionstagen wurden Gingivalindizes gemessen, Plaqueproben entnommen und auf ihren Gehalt an Gingivitis verursachenden Aerobiern (CFU) im Vergleich zum Ausgangswert hin getestet. Im Ergebnis konnte die Methode des Sesamölziehens die gleich hohe Reduktion der Bakterien und der Gingivalindizes erzielen wie die Positivkontrollen mit Chlorhexidin (Asokan *et al.* 2009).

Eine weitere Studie mit Sesamöl beobachtete eine um 20 % reduzierte Bakterienanzahl über 40 Tage sowie eine moderat antimikrobielle Aktivität des Sesamöls auf Karies verursachende Laktobazillen wie *S. mutans* oder *L. acidophilus* (Anand T.D. *et al.* 2008). Wegen seiner guten antioxidativen Eigenschaften wird Reisöl in der Literatur als wirkungsvolle Alternative zum Sesamöl als Ziehmedium beschrieben (Sheikh und Iyer 2016).

Sroisiri Thaweboon *et al.* untersuchten verschiedene Öle (Kokosöl, Maisöl, Palmöl, Reisöl, Sesamöl, Sojaöl und Sonnenblumenöl) auf ihre Effektivität gegen *in vitro* Biofilmmodelle von *S. mutans*, *L. casei* und *C. albicans*. Dabei hatte Kokosöl einen antimikrobiellen Effekt auf *S. mutans* und *C. albicans*, Sesamöl gegen *S. mutans* und Sonnenblumenöl gegen *C. albicans*. *L. casei* zeigte eine Resistenz gegen alle Ölsorten (Sroisiri Theweboon *et al.* 2011).

Ergänzend wurde auch mit 0,25 % Zitronengrasöl-Mundspüllösungen im Jahr 2015 eine klinische Studie angefertigt und mit 0,2 % Chlorhexidin als Ziehmedium verglichen. Die Studie umfasste 60 Probanden und einen Zeitraum von 21 Tagen. Dabei wurde die Spüllösung zweimal täglich für eine Minute angewendet. Die Gruppe, die Zitronengrasöl verwendete, zeigte insgesamt signifikant bessere Plaque- und Gingivalindizes als die Kontrollgruppe mit Chlorhexidin (Dany *et al.* 2015).

Asokan *et al.* führten eine Studie mit 20 Teilnehmern durch, wobei Sesamölziehen im Vergleich mit einer Chlorhexidingruppe über zwei Wochen durchgeführt wurde. Dabei

wurde *S. mutans* mithilfe von Dentocult SM Kits in Plaque und Speichel ausgezählt. Es zeigte sich bei beiden Gruppen eine signifikante Reduktion (bei Öl nach 7 Tagen), wobei die Chlorhexidingruppe eine deutlich höhere Reduktion vorweisen konnte (Asokan *et al.* 2008). Im Jahr 2011 konnte die selbe Arbeitsgruppe ebenfalls eine klare Reduktion von *Halitosis* und dessen verursachenden Mikroorganismen (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*) durch Sesamölziehen nachweisen (Asokan *et al.* 2011a). Dem im Sesamöl enthaltenen Sesamin und Sesamolin konnte *in vitro* kein antimikrobieller Effekt auf *S. mutans*, *S. mitis* und *S. viridans* zugesprochen werden, jedoch steigt die Emulsifikation (Verseifung durch Esterspaltung) während des Ölziehens fortschreitend an (Asokan *et al.* 2011b).

Auch Saravanan *et al.* führten im Jahr 2013 eine Studie mit 40 Teilnehmern und Sesamölziehen über 45 Tage durch und bestätigten die Effektivität des Ölziehens als ergänzende orale Hygienemaßnahme. Dabei wurde ein Teelöffel Öl für 15–20 min verwendet. Als Analyseparameter dienten: CFU, Gingivalindex und Plaqueindex (Saravanan D *et al.* 2013).

Singla *et al.* untersuchten bei 32 Probanden in vier Gruppen, über drei Wochen den Effekt einer 10-minütigen Zahnfleischmassage mit jeweils 2 ml Sesamöl, Olivenöl, Kokosöl und Chlorhexidingel nach dem Zähneputzen. Dabei beobachteten die Autoren eine simultane Reduktion von *S. mutans* und *Lactobacillus* im Speichel sowie die Abnahme der Plaque- und Gingivalindizes. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden nicht nachgewiesen (Singla *et al.* 2014).

Es gibt unterdessen auch Studien, die keine gesundheitsfördernde Wirkung des Ölziehens nachgewiesen haben. So konnte Sesamöl über einen Zeitraum von zwei Wochen bei Kindern im Alter zwischen 6 und 12 Jahren keine Reduktion von *S. mutans* (dem hauptverursachenden Keim der Karies) im Vergleich zu fluoridhaltigen Mundspüllösungen nachgewiesen werden (Jauhari *et al.* 2015).

Gbinigie *et al.* kritisieren in einem Review die nicht signifikanten Unterschiede der Ölziehgruppen und der Chlorhexidinkontrollgruppen in fünf der oben genannten Studien (Asokan *et al.* 2008; Asokan *et al.* 2009; Asokan *et al.* 2011a; Sood *et al.* 2014; Saravanan D *et al.* 2013). Auch die relativ niedrige Anzahl an Teilnehmern sowie die nicht widerspruchsfreien Ergebnisse der bewerteten ORG1-Punkte (Objective, Organoleptic, Breath, Assessment) werden infrage gestellt (Gbinigie *et al.* 2016). Zusammenfassend werden die bisherigen Ergebnisse kontrovers diskutiert.

1.7 Risiken des Ölziehens

Es sind derzeit insgesamt drei Fallberichte bekannt, die eine Aspiration von Sesamöl während des Ölziehens mit einer lipoiden Pneumonie in Verbindung bringen (Kim *et al.* 2014; Kuroyama *et al.* 2015).

1.8 Zielsetzung

Moderne Mundspüllösungen oder Mundwässer zur Keimreduktion enthalten meist Chlorhexidin, Fluoridverbindungen (Salze) oder Alkohol in Kombination mit ätherischen Ölen. In einer Studie mit 1.963 Krebspatienten konnte zudem erstmals der Gebrauch von Mundwässern mit einem erhöhten Risiko für das Entstehen von Mundhöhlen- und Kehlkopfkarzinomen in Zusammenhang gebracht werden (Ahrens *et al.* 2014). Zu Chlorhexidin als oralem Antiseptikum liegen dem deutschen Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) derzeit 147 anaphylaktische Zwischenfallberichte vor. Auch sind für Chlorhexidin gastrointestinale Nebenwirkungen sowie Zahnverfärbungen und Desquamation der oralen *Mucosa* beschrieben worden (Flötra *et al.* 1971).

Das Ölziehen als risikoarme Methode zur Keimreduktion in der Mundhöhle erfreut sich bei praktischen Ärzten und Zahnärzten immer größerer Beliebtheit. Das primäre Ziel dieser Arbeit ist die wissenschaftlich-taxonomische Untersuchung der Effektivität des Ölziehens als ergänzende orale Hygienemaßnahme, da bisher nur klinische Daten zu diesem Thema erhoben worden sind. Die genauere wissenschaftliche Betrachtung dieser ayurvedischen Praktik scheint attraktiv, da die beschriebenen Öle (Sonnenblumenöl, Sesamöl, Kokosöl, Leinsamenöl) günstig in der Herstellung sind und potentiell die weltweite Mundgesundheit – vor allem in finanzschwachen Regionen der Erde – maßgeblich verbessern könnten.

Für diese retrospektive Pilotstudie wurde reines Sonnenblumenöl (*Oleum Helianthi raffinatum*) des Herstellers Caesar & Loretz® GmbH verwendet, da es frei von Zusätzen und in standardisierter, pharmazeutischer Qualität erhältlich ist.

Die entwickelten Methoden aus dieser Arbeit zur bakteriellen DNA-Verarbeitung aus Ölziehproben, die Entwicklung einer Mock-Community als Referenzbibliothek sowie der Einsatz des Next-Generation Sequencings mit den variablen Regionen der 16S rDNA, sollen als Grundlage zu weiteren randomisierten klinischen Untersuchungen bis hin zur umfassenden oralen Metagenomanalyse dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchung von Humanpräparaten

Im Rahmen dieser Dissertation wurden oral gewonnene Speichelproben zu medizinischen Zwecken molekular- und mikrobiologisch untersucht. Die Probanden haben sich schriftlich einverstanden erklärt, die gewonnenen Sekrete dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der JLU Gießen für die wissenschaftliche Auswertung zur Verfügung zu stellen (Seite 102). Die bei der Auswertung gewonnenen Proben und Daten wurden anonymisiert und nach Abschluss des Projektes ordnungsgemäß autoklaviert bzw. vernichtet. Die Datenanalyse, die der Grundlagenforschung dient, wurde rein deskriptiv durchgeführt. Die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der JLU Gießen hat dem eingereichten Antrag am 18.05.2016 ohne rechtliche und wissenschaftliche Mängel stattgegeben (Az 97/16). Die Studie wurde als retrospektiv klassifiziert und ist unter folgender Registriernummer bei der DRKS (Deutsches Register Klinischer Studien) zu finden: DRKS00011922

2.2 Charakterisierung des Probandenkollektivs

An der Studie haben drei Personen (n = 3) unterschiedlichen Alters und Geschlechts teilgenommen.

Tabelle 2: Probandenkollektiv

Personen	Alter (Jahre)	Geschlecht	Anamnese	Mundhygiene/-maßnahmen
Proband A	57	männlich	gesund, omnivor, Nichtraucher	gut/normal + 1 × tägl. Ölziehen
Proband B	25	männlich	gesund, omnivor, Nichtraucher	gut/normal
Proband C	28	weiblich	gesund, omnivor, Nichtraucher	gut/normal

Normale Mundhygienemaßnahmen beinhalten täglich mindestens 2 × Zähneputzen über 2 min sowie der Gebrauch von Interdentalbürste oder Zahnseide zur Zahnzwischenraumreinigung 3 × wöchentlich. Der orale Gesundheitsstatus wird bei allen Probanden halbjährlich von Hauszahnarzt untersucht und bestätigt. Der allgemeine Gesundheitszustand wird von den Probanden subjektiv angegeben.

2.3 Sicherheitsmaßnahmen und Sterilitätsbedingungen

Im Labor wurde stets auf die eigene und die Sicherheit der Kollegen größtmöglichen Wert gelegt. Der Arbeitsplatz wurde ausschließlich mit Laborkittel und Einmalhandschuhen aus Nitril betreten (Ausnahme: PCR Workstation). Bei flüchtigen Chemikalien wie Chloroform, Phenol oder Alkohol wurde unter einer Bench (Sterilwerkbank mit Glasschutzscheibe und Luftzirkulationsabsaugsystem) gearbeitet. Immer wurden sämtliche Maßnahmen zur Unfallverhütung sowie Sicherheitsunterweisungen eingehalten. Zur Dekontamination wurden die Arbeitsflächen nach Beendigung der Versuche desinfiziert und entstandener Abfall autoklaviert und umweltgerecht entsorgt. Die Versuche wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe S2 (Biotoffverordnung) durchgeführt. Die obligate hygienische Händedesinfektion vor dem Betreten und Verlassen der Laboreinrichtung wurde stets beachtet.

2.4 Kultur- und Nährmedien

Schafblut-Agar (COLS): Nährboden zur Kultivierung eines breiten Spektrums von Keimen mit unterschiedlichem Hämolyseverhalten. Inhalt: 30 g Columbia Agar, 750 ml Wasser und 37,5 ml (5 %) defibriniertes Schafblut, eingestellt auf pH 7,3, Inkubationstemperatur 37 °C, 24–48 h bei 5,0 % CO₂.

Kochblut-Agar (CHOCV): (Schokoladenagar) Bei 60 °C denaturierter Schafblut-Agar (8 %). Durch die Lyse der Erythrozyten wird Hämin und NAD frei, welche selektiven Bakterien als Nährmedium dienen, wie v. A. *Haemophilus*. Eingestellt auf pH 7,2 Inkubationstemperatur 37 °C, 24–48 h bei 5,0 % CO₂.

MacConkey-Agar (MAC): Selektivnährboden bestehend aus 17 g/l Caseinpepton, 3 g/l Fleischpepton, 13,5 g/l Agar-Agar, 10 g/l Laktose, 5 g/l NaCl, 1,5 g/l Gallelsalzmischung, 0,03 g/l Neutralrot und 0,001 g/l Kristallviolett zur Anzucht von gramnegativen *Enterobacteriaceae* und Nonfermentern (z. B. *E. coli*). Eingestellt auf pH 7,1 Inkubationstemperatur 37 °C, 24–48 h.

Schaedler-Agar: Zur nicht selektiven Isolierung von Anaerobiern und zur selektiven Isolierung von gramnegativen anaeroben Stäbchen, insbesondere der *Bacteroides*- und *Prevotella*-Spezies. Bestandteile: 8,2 g/l Trypton, 2,5 g/l Fleischpepton, 1 g/l papainisch abgebautes Sojamehl, 5,8 g/l Glukose, 5,0 g/l Hefeextrakt, 1,7 g/l NaCl, 0,8 g/l Dikaliumhydrogenphosphat, 0,4 g/l L-Cysteinhydrochlorid, 0,01 g/l Hämin, 0,01 g/l Vitamin K₁, 3,0 g/l Tris-hydroxymethyl-aminomethan, 13,5 g/l Agar-Agar, 5 g/l

defibriniertes Schafblut. Eingestellt auf pH 7,6, Inkubationstemperatur 37 °C, 24–120 h im Anaerobiertopf mit Anaerobierstreifen.

Sabouraud-Dextrose-Agar (SAB): Selektivnährboden zur Anzucht von Schimmelpilzen, Dermatophyten und Hefen (insbesondere *Candida* Spezies). Inhaltsstoffe: 5,0 g/l Trypton, 5,0 g/l Fleischpepton, 40 g/l Glukose, 15 g/l Agar-Agar. Eingestellt auf pH 5,6, Inkubationstemperatur 37 °C 24–48 h.

Brain-Heart-Infusion Medium (BHI): Mehrzweckflüssignährmedium zur Kultivierung zahlreicher Arten von filamentären Pilzen und Bakterien, insbesondere von *Staphylococcus aureus*. Zusammensetzung für 1 l Wasser: 8,0 g Hirn-Herz-Infus, 5,0 g Fleischpepton, 16,0 g Trypton, 5,0 g NaCl, 2,0 g Glukose, 2,5 g Dinatriumhydrogenphosphat. Eingestellt auf pH 7,2, Inkubationstemperatur 37 °C, 18 h, 180 rpm.

Lysogeny-Broth Medium (LB): Komplexes Flüssignährmedium zur Anzucht von Bakterien (*Enterobacteriaceae* und Nonfermenter) insbesondere *Klebsiella pneumoniae* und *E. coli*. Inhaltsstoffe pro 1 l Wasser: 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 10 g NaCl. Eingestellt auf pH 7,0, Inkubationstemperatur 37 °C, 18 h, 180 rpm.

2.5 Ausplattieren

Das Ausplattieren erfolgte stets mit einem sterilen Einmalspatel. Hierzu wurden 100 µl einer Probe mittig auf die Agarplatte aufgetragen und bei moderatem Druck und einer kontinuierlich-kreisenden Ausstreichbewegung aus dem Handgelenk gleichmäßig verteilt, bis ein Widerstand durch Antrocknen der Probenflüssigkeit eintrat. Das Ausplattieren fand nur unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank auf einem Drehtisch statt.

2.6 Verdünnungsreihe

Die Verdünnungsreihe (Zehnerverdünnungsreihe) wurde von 10^0 – 10^{-7} durchgeführt. Dabei wurden 100 µl Probe in je 900 µl NaCl (0,9 %) pipettiert, gemischt und dieser Vorgang mehrfach wiederholt. Das Produkt war eine exponentielle Verdünnung, welche anschließend auf Agarplatten aufgebracht, ausplattiert und inkubiert wurde.

2.7 Verdünnungsausstrich

Der Verdünnungsausstrich (Dreiösenausstrich) wurde ebenfalls unter sterilen Bedingungen mit Einmalimpfeschlinge auf einer Agarplatte zur Separation einzelner

Bakterienkolonien aus den Öl/NaCl-Spülproben durchgeführt, um diese mithilfe des MALDI-TOF Massenspektrometers zu identifizieren.

2.8 Bakterienstämme, Mock-Community und Übernachtskulturen

Tabelle 3: Mock-Community und Stammsammlungen (ÜNK)

Gattung (Mock-C.)	Spezies	Morphologie	Gram +/-	Stamm	EDCC	DSMZ	MM
<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i>	Stäbchen	Gram ⁻	654 MRGN	5502		
<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	Stäbchen	Gram ⁺	13		31	
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	Kokke	Gram ⁺	Symbioflor 1		16431	
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	Stäbchen	Gram ⁻	MG 1655	2009	18039	
<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	Stäbchen	Gram ⁺	#22	5492	103825	
<i>Listeria</i>	<i>mono- cytogenes</i>	Stäbchen	Gram ⁺	EGDe	2100		
<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>	Kokke	Gram ⁻			9143	
<i>Neisseria</i>	<i>meningitidis</i>	Kokke	Gram ⁻	21		10036	
<i>Porphyromonas</i>	<i>gingivalis</i>	Stäbchen	Gram ⁻	W 83	5503		
<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>	Stäbchen	Gram ⁺	KPA171202		16379	
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	Stäbchen	Gram ⁻	PAO 1		19880	
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	Kokke	Gram ⁺	DFS 042	5430		
<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	Kokke	Gram ⁺	G 19		2134	
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	Kokke	Gram ⁺	TIGR 4			3388
Gattung (ÜNK)							
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	Stäbchen	Gram ⁻		5028		
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	Kokke	Gram ⁺	DFS 042	5430		

DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

EDCC = Eugen Domann Culture Collection

MM = Medizinische Mikrobiologie der JLU Gießen

2.9 Chemikalien

Agarose Standard	Carl Roth® GmbH + Co.KG (Karlsruhe)
Agarplatten	Oxoid™ by Thermo Fisher Scientific®
Agilent 1000 DNA Kit	Agilent technologies® (Waldbronn)
Anaerocult® A für die Mikrobiologie	Merck KGaA (Darmstadt)
Borsäure	Merck KGaA (Darmstadt)
Bromphenol Blue Na-salt	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg Germany)
Chloroformisoamylalkohol 24:1	Sigma-Aldrich® (St. Louis USA)
DNA Ladder (1 kb Plus)	Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific® (USA)
DNA LoBind Tube 1.5 ml	Eppendorf AG (Hamburg Germany)
DNA-ExitusPlus IF™	AppliChem® GmbH (Darmstadt)
Ethanol, puriss. p.a. absolute, ≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich® (St. Louis USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth® GmbH + Co.KG (Karlsruhe)
Ficoll® 400	Carl Roth® GmbH + Co.KG (Karlsruhe)
Flüssignährmedien (BHI/LB)	Becton Dickinson GmbH
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung 4,1 g/l	Merck KGaA (Darmstadt)
HT1 Buffer prechilled	Illumina® (San Diego USA)
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich® (St. Louis USA)
Isopropanol	Sigma-Aldrich® (St. Louis USA)
KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (2X)	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Lysostaphin von <i>Staphylococcus staphylolyticus</i> ≤ 500 Units/mg	Sigma-Aldrich® (St. Louis USA)
Lysozyme (from egg white) ≥ 30000 Units/mg	Merck KGaA (Darmstadt)
Methanol, puriss. p.a., absolute, ≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich® (St. Louis USA)
MiSeq™ Reagent Kit v2	Illumina® (San Diego USA)
Mutanolysin ≤ 4000 Units/mg	Sigma-Aldrich® (St. Louis USA)
Natriumacetat 3 M	Merck® & Co. (USA)
Natriumchlorid isoton 0,9 %	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Natronlauge 10 M in H ₂ O	Sigma-Aldrich® (St. Louis USA)
Phenol ≥ 99,5 %	Carl Roth® GmbH + Co.KG (Karlsruhe)
PhiX Control v2	Illumina® (San Diego USA)
Phusion™ Flash PCR Master Mix F-548 (2X)	Thermo Fisher Scientific® (USA)
Primer (Prokaryonten-PCR) 1407-R	Eurofins Genomics (Ebersberg)
Primer (Prokaryonten-PCR) 933-F	Eurofins Genomics (Ebersberg)
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific® (USA)
Sonnenblumenöl nativ REWE Bio	REWE Group GmbH (Köln)
Sonnenblumenöl <i>Oleum Helianthi raffinatum</i> Produkt Nr. 7309	Caesar & Loretz® GmbH (Hilden Germany)
Tris (10mM) pH 8,5	QIAGEN® GmbH (Hilden Germany)
Tris Handelsname PUFFERAN® ≥ 99,9 %	Carl-Roth® GmbH+Co. KG (Karlsruhe)
Triton® X-100	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Wasser (Nuclease-Free)	QIAGEN® GmbH (Hilden Germany)
Wasser (Reinstwasser)	Merck® Millipore Ltd. (Irland)

2.10 Verbrauchsmaterialien

Agencourt AMPure XP®
Cellstar® Tubes 50 ml
Deckgläschen 24 × 60 mm
Einmalpipetten 50 ml CELLSTAR®
Einmalspritzen, 2-teilig, Injekt®, 2 ml
Entsorgungsbeutel
Eppendorf Safe-Lock Tubes® 1,5, 2 ml
Erlenmeyerkolben 100 ml
Filterspitzen 10, 20, 100, 200, 1000 µl
Impfeschlingen 10 µl
Kanülen 0,9 × 40 mm
Küvetten 10 × 4 × 45 mm Polysterol
Microtubes PCR TUC0010
Nitril Handschuhe NITRA-TEX
Objektträger: ca. 76 × 26 mm
PARAFILM "M"®
Petrischalenspatel Delta™
pH-Fix 0-14 Indikatorstäbchen
PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit
PureLink™ Genomic DNA Mini Kit
Qubit™ sdDNA HS Assay Kit
Schott-Laborglasflaschen 200 ml, 1000 ml
Sterilfilter: Millex®GV Filter Unit 0.22 µm

Beckman Coulter GmbH® (Germany)
Greiner BioOne GmbH® (Frickenhäusen)
R. Langenbrinck (Emmendingen)
Greiner BioOne® GmbH (Frickenhäusen)
B Braun (Melsungen)
Carl Roth® GmbH + Co.KG (Karlsruhe)
Eppendorf AG® (Germany)
Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Nerbe plus® GmbH (Winsen/Luhe)
SARSTEDT AG & Co (Nürnberg)
Becton Dickinson (Heidelberg)
SARSTEDT AG & Co (Nürnberg)
Thermo Fisher Scientific® (USA)
Ansell Healthcare Europe N.V.
R. Langenbrinck (Emmendingen)
PARAFILM® (USA)
Carl Roth® GmbH + Co.KG (Karlsruhe)
Macherey-Nagel®, Artikel 921 10
MO BIO Laboratories, Inc. (QIAGEN®)
Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific®
Invitrogen™ life technologies (USA)
Schott AG (Mainz)
Merck® Millipore Ltd. (Irland)

2.11 Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer
Anaerobiertopf 2,5 l
Bench Clean Air type CAIRE 4
Centrifuge 5424R Eppendorf
Centrifuge Combi Spin FVL-2400N
Centrifuge Perfect Spin 24
Drehtisch Sensor Turm pro
Elektrophoresekammer
Fastprep MP™
Fluoreszenzmikroskop Biozero, BZ-8000
Gefrierschrank -20 °C Bosch GSV30V23
Gefrierschrank -80 °C HFU600TV63
Geldokumentationsgerät Universal Hood II
GeneAmp® PCR System 9700
Inkubationsschüttler IKA® KS 4000i control
Inkubator (CO₂) labotect C16

Inkubator Heraeus Typ: B6060
Kamera Nikon Coolpix L840
Kühlschrank 4 °C CN 3956
MALDI-TOF VITEC MS Nr. 60456/09
Millipore Milli-Q Filteranlage
MiSeq™ (Next-Generation-Sequencing)

Agilent technologies®, Inc. (USA)
Merck® KGaA (Darmstadt)
Thermo Fisher Scientific® (USA)
Eppendorf AG® (Germany)
Preglab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Preglab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
WLD-TEC GmbH (Göttingen)
Eigenentwurf der Institutswerkstatt
MP Biomedicals® GmbH (USA)
Keyence® GmbH (Deutschland)
Robert Bosch® GmbH (India)
Thermo Fisher Scientific® (USA)
Bio-Rad Laboratories®, Inc. (USA)
PE Applied Biosystems®
IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Labotect IKA® Labor-Technik-Göttingen GmbH
Heraeus Instruments® GmbH
Nikon Corporation® (Japan)
LIEBHERR International AG.
bioMérieux (Fance)
Merck® KGaA (Darmstadt)
Illumina® San Diego (USA)

NanoDrop™ 1000 Spectrometer	Thermo Fisher Scientific® (USA)
PCR Workstation Air Clean 600	Thermo Fisher Scientific® (USA)
Piko™ Thermal Cycler	FINNZYMES Instruments by Thermo Fisher Scientific® (USA)
PIPETBOY 2 INTEGRA	ibs tecnomara GmbH
Pipetten 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Biohit® by Biozym Scientific GmbH
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments® GmbH & Co KG
Präzisionswaage 770-12	Kern & Sohn® GmbH (Balingen-Frommern)
Qubit™ 2,0 Fluorometer	Invitrogen™ Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Spectrophotometer GENESYS 10S-UV-Vis	Thermo Fisher Scientific® (USA)
Sterilbank (Bench) Clean Air type CAIRE 4	Thermo Fisher Scientific® (USA)
Thermoblock BioShake iQ	QUANTIFOIL® GmbH (Jena)
Vortex-Genie®2	Carl Roth® GmbH + Co. KG (Karlsruhe)

2.12 Software und Datenbanken (Bioinformatik)

ChimeraSlayer Software (Haas *et al.* 2011)
Citavi Version 5.5
EMPeror Software (Vazquez-Baeza *et al.* 2013)
Fast-QC Software (Babraham Bioinformatics, 2016)
FastTree Software (Price *et al.* 2010)
Microsoft Excel 2010, 14.0.7177.5000
Microsoft Paint 2007 Version 6.1
Microsoft Word 2007 Version 6.1
MiSeq™-reporter Software (Illumina® 2016)
mothur/SILVA
Motifolio-PPT-Slides-Suite
PANDASEq Software (Masella *et al.* 2012)
PyNASt Software (Caporaso *et al.* 2010)
QIIME™/Greengenes
uclust Software (Edgar 2010)

Die FASTQ-Dateien wurden mit Hilfe der MiSeq™-reporter Software (Illumina 2016) generiert. Die anschließende Qualitätskontrolle wurde mit der Fast-QC Software (Babraham Bioinformatics, 2016) durchgeführt und die Primersequenzen mittels der PANDASEq Software (Masella *et al.* 2012) entfernt. Nicht eindeutig identifizierte Homopolymere mit mehr als neun Nukleotiden wurden simultan entfernt. Die bioinformatische Analyse wurde mit QIIME™/Greengenes und mothur/SILVA durchgeführt, sowie generierte OTUs (operational taxonomic units) mittels uclust Software (Edgar 2010) bearbeitet. Zur Entfernung chimerischer Sequenzen wurde die ChimeraSlayer Software (Haas *et al.* 2011) verwendet. Die Visualisierung der Principal-Coordinates-Analysis wurde mittels EMPeror Software (Vazquez-Baeza *et al.* 2013) durchgeführt. Die erstellten Grafiken und die statistische Analyse wurden mithilfe von Microsoft Excel generiert.

2.13 Laborspezifische Begriffe

Agar	Nährboden aus Agarose und Agaropectin zur Kultivierung von Bakterien und Pilzen
Amplifikat/Amplikon	Reproduziertes DNA-Fragment aus einer PCR
DNA-Aufreinigung	Entfernung von Verunreinigungen (Primern, Nukleotiden) nach einer PCR
DNA-Extraktion	Isolierung der Erbinformationen aus einer Probe
DNA-Marker	Gemisch aus DNA-Fragmenten verschiedener Größe
Gelelektrophorese	Auftrennung der DNA-Fragmente nach Größe durch ein elektrisches Feld in einem Agarosegel
Kit	Industrielle Material- und Chemikalienzusammenstellung für einen spezifischen Verwendungszweck
Mastermix	Erstelltes Gemisch bestehend aus Primern, Nukleotiden, Polymerase und Wasser (Grundlage für die PCR)
Mock-Community	Definierte Mixtur bakterieller Zellen zur <i>in vitro</i> Simulation des zu untersuchenden Mikrobioms
Nukleotide	Bausteine der DNA (A, C, G, T)
OD ₆₀₀	Extinktionsmessung der Zelldichte in Suspensionen mithilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 600 nm. Bei Kenntnis des Extinktionskoeffizienten kann die Konzentration der Bakterienlösung errechnet werden.
Polymerase	Enzym, welches ein durch Primer zuvor markiertes DNA-Teilstück durch die Aneinanderreihung von Nukleotiden repliziert
Pool	Gemisch aus DNA-Konglomerat (verschiedene Proben) gleicher Konzentration
Primer	Oligonukleotide, welche an einen definierten Bereich der Einzelstränge der DNA binden und sie für die Polymerase markieren
Read (count)	Bei der Sequenzierung (einfach) identifiziertes Bakterium
Sequenzierung	Detektion der Basenabfolge eines DNA Stangs
Stocklösung	Hochkonzentrierte Lösung als Grundlage für Arbeitslösungen
Template	DNA, welche in der PCR eingesetzt wird
Tube	1,5–2 ml Eppendorfreagenzgefäß (oder gleichwertig)
Vortex / vortexen	Gerät, welches durch Rotation Proben durchmischt / Anwendung des Gerätes zur Probendurchmischung

2.14 Probengewinnung

Die Probengewinnung startete morgens um ca. 07.00 Uhr, da in der Schlafphase die Speichelsekretion durch den zirkadianen Rhythmus abnimmt (Dawes 2004) und die bakterielle Konzentration somit wahrscheinlich am höchsten ist. Es wurden primär 5 min lang Ruhespeichel in einem 50 ml Greiner-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Diese erste Probe diente der Vorkontrolle und als Referenz.

Anschließend wurden 15 ml Sonnenblumenöl bzw. NaCl (0,9 %) oral aufgenommen und kontinuierlich für 15 min durch die Zahnreihen gezogen. Die dabei entstandenen Öl-Speichel-/NaCl-Speichel-Gemische wurden nach Ablauf der Zeit in ein 50 ml Greinerröhrchen entleert.

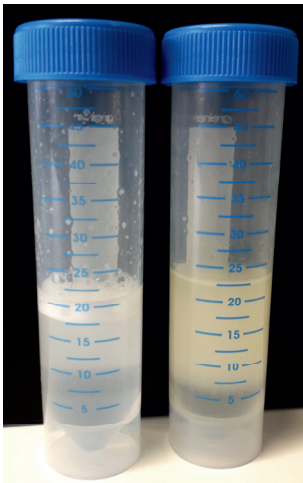


Abbildung 1: Exemplarische Darstellung oraler NaCl- (links)/Ölziehprobe (rechts), Proband B

Es folgte eine 5-minütige Pause, um verbliebene NaCl-/Öl-Rückstände enteral zu eliminieren. Anschließend wurde analog zur Vorkontrolle 5 min lang Ruhespeichel in einem 50 ml Greiner-Zentrifugenröhrchen als Nachkontrolle gesammelt. Alle Proben wurden bis zu ihrem Eintreffen im Institut für Medizinische Mikrobiologie der JLU Gießen 1,5 h bei RT gelagert.

2.14.1 Zyklischer Aufbau des Hauptversuchs

Der Versuchsablauf fand für alle Probanden simultan 5 Tage in Folge vom 10.05.2016–14.05.2016 für NaCl (0,9 %) und vom 21.05.2016–25.05.2016 für Sonnenblumenöl statt. An 2 von 5 Tagen wurde lediglich einmalig 5 min lang Ruhespeichel zu Referenzzwecken entnommen: Für NaCl (0,9 %) am ersten und letzten Tag (10.05.2016 und 14.05.2016) und für Sonnenblumenöl an den letzten zwei Tagen (24.05.2016 und 25.05.2016). Der Zeitraum zwischen den Versuchswochen betrug dabei 6 Tage.

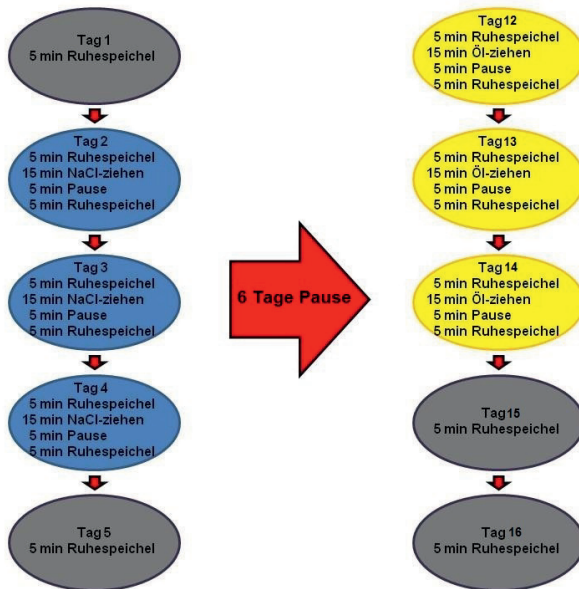


Abbildung 2: Versuchsablauf Hauptversuch, Probengewinnung

2.14.2 Dokumentation und Verarbeitung des Probenmaterials

Gewicht, Volumen und Anteile [Speichel, Öl und NaCl (0,9 %)] der Speichel- bzw. Ziehproben wurden exakt gemessen und dokumentiert (Tab. 13, 14).

Von jeder Probe wurden je 100 µl unter einer sterilen Arbeitsbank (Bench) auf verschiedene Nährböden (Agarplatten) COLS, CHOCV, MAC, Schaedler, SAB ausplattiert.

Die Inkubationszeit betrug 24 h bei 37 °C, 19,8 % O₂ und 5,0 % CO₂. Die Schaedlerplatte wurde in einem luftdichten Anaerobiertopf unter Zuhilfenahme eines Anaerobierstreifens unter Ausschluss von Sauerstoff für bis zu 5 Tage inkubiert.

Für eine quantitative Aussage wurde von allen Proben eine Zehnerverdünnungsreihe auf Blutagarplatten von 10⁰ bis 10⁻⁷ mit je 100 µl Probensekret und 900 µl NaCl (0,9 %) in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß angefertigt (Kapitel 2.6). Dabei wurden die Proben jeweils für 5 s gevortext, um einer eventuellen Phasentrennung vorzubeugen.

Zur weiteren molekularbiologischen Untersuchung sowie der DNA-Extraktion wurden 1,5 ml Speichelprobe in einem 1,5 ml Tube bei 13.300 rpm, 10 min, RT zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abpipettiert und das verbliebene Bakterien- und Epithelzellpellet in 1 ml NaCl (0,9 %) resuspendiert, 5 s gevortext und erneut 13.300 rpm, 10 min, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und verworfen. Lag eine Öl/Speichel-Emulsion vor, wurde der erste Überstand in einem separaten 1,5 ml Reaktionsgefäß zweimalig einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen (Kapitel 2.16.1). Die Pellets wurden bis zur weiteren Verarbeitung tiefgekühlt bei -20 °C gelagert.

2.15 Positiv- und Negativkontrollen

Zum Ausschluss von Kontaminationen und zur Beurteilung der Qualität und Quantität der Extraktionsmethode sowie der Probenverarbeitung wurden Positiv- und Negativkontrollen (1,5 ml) in je dreifacher Ausführung angefertigt. Nukleasefreies Wasser wurde bei jeder PCR sowie beim Verdünnen und Konzentrationseinstellung der DNA verwendet. Sonnenblumenöl und NaCl (0,9 %) dienten als Ziehmedium, wobei das Öl als alleiniges Medium nicht verarbeitet werden konnte (kein vorhandenes wässriges Produkt aus der Phenol-Chloroform-Extraktion), weshalb es im gleichen Verhältnis 1:1 mit NaCl (0,9 %) gemischt wurde. In der Mock-Community, die als Positivkontrolle diente, wurden die Bakterien aus Tabelle 3 eingesetzt. Die Stämme wurden jeweils auf eine OD von 600 nm bzw. eine Konzentration von $\sim 1 \times 10^9$ /ml eingestellt, um ein homogenes Bakterienkonglomerat (Finalkonzentration $\sim 1 - 2 \times 10^9$ /ml) zu gewährleisten. Die Ziehproben wurden *in vitro* simuliert, indem die Mock-Community mit Öl bzw. NaCl (0,9 %) vermischt und gevortext wurde. Sowohl Öl, NaCl (0,9 %) aus auch H₂O stammen aus je einer Flasche. Wurde aus einer Probe sowohl DNA aus Pellet und Überstand gewonnen, wurde eine kombinierte Gesamtprobe aus 80 Vol.-% Pellet und 20 Vol.-% Überstand erstellt, um die Gesamtheit einer Probe, die aus Pellet und Überstand besteht, zusammenzufassen.

Tabelle 4: Positiv-/Negativkontrollen

Kontrolle 1–3	Kontrolle 4–6	Kontrolle 7–9	Kontrolle 10–12	Kontrolle 13–15
H ₂ O nukleasefrei	NaCl (0,9 %)	Öl + NaCl (0,9 %)	Öl + Mock- Community	NaCl (0,9 %) + Mock-Community

2.16 DNA Extraktionsmethoden

Für die Extraktion der bakteriellen chromosomalen DNA wurden folgende Methoden und Reaktions-Kits verwendet:

- **Phenol-Chloroform-Extraktion** für ölhaltige Überstände
- **Invitrogen™ PureLink Extraktionskit** für Pellets
- **MO BIO® PowerLyzer Extraktionskit** für Pellets

2.16.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion (nach Chomczynski und Sacchi 1987) wurde für ölhaltige Proben durchgeführt um:

1. Das Öl aus der Probe zu eliminieren
2. Verbliebene bakterielle DNA aus der Interphase (Abb. 20) zu extrahieren.

Zu Beginn wurde eine ausreichende Menge kristallines Phenol in einem 2 ml Reaktionsgefäß bei 58 °C auf einem Thermoblock geschmolzen. Es wurde eine 1:1-Mischung aus Phenol und Chloroform:Isoamylalkohol 24:1 hergestellt und für 5 s gevortext. Die ölhaltigen Überstände wurden in ein separates 1,5 ml Tube pipettiert. Nun wurde 1 Vol. (in Abhängigkeit vom vorhandenen Überstandsvolumen) der präparierten Mischung auf die Probe gegeben und erneut 5 s gevortext. Anschließend folgte das Zentrifugieren bei 13.300 rpm, 15 min, RT. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und die Prozedur wiederholt (zweifach phenolisiert).

Zur Fällung der DNA wurde 1 Vol. Probe und 10 Vol.-% Natriumacetat 3 M / pH 7 zu-pipettiert und die Probe dreifach invertiert. Zusätzlich wurden folgend 2 Vol. Isopropanol hinzugefügt und erneut per Hand invertiert. Das Fällern wurde wahlweise bei -80 °C für 20 min oder bei -20 °C über Nacht durchgeführt.

Es folgte ein Waschschriff bei dem der Überstand (nach Zentrifugation bei 13.000 rpm, 10 min, 4 °C) verworfen wurde. Der leicht weiß schimmernde DNA-Niederschlag wurde mit 1 ml eiskalten 70%igen Ethanol gewaschen. Es folgte ein erneutes Abzentrifugieren

bei 13.000 rpm, 10 min bei 4 °C. Anschließend wurde die gesamte Flüssigkeit sorgfältig abgenommen. Die Proben wurden unter der PCR-Work-Station 30 min luftgetrocknet und die DNA final mit nukleasefreiem Wasser (50 µl) 1 h resuspendiert und vor der weiteren Verwendung bei -20 °C tiefgefroren.

2.16.2 DNA-Extraktion mit dem Invitrogen™ PureLink Kit

2.16.2.1 Ansatz des Lysozyme Digestion Buffers

- 1,25 ml 1 M Tris-HCl pH 8,3 in Wasser (25 mM)
- 2,5 ml 0,5 M EDTA in Wasser (25 mM)
- 500 µl Triton X-100 in Wasser (1 %)
- 45,75 ml H₂O (steril)

Der Puffer wurde in einem 50 ml Greinerzentrifugenröhrchen angesetzt und auf einem Taumelschüttler über Nacht gemischt.

2.16.2.2 Ansatz der Enzyme

Lysozympuffer (20 mg/ml):

Das Lysozym wurde für die optimale Enzymaktivität stets frisch angesetzt. Dazu wurden 30 mg Lysozym abgewogen und mit 1,5 ml Lysozym-Digestion-Buffer versetzt. Das Gemisch wurde gevortext und unter der Bench mit einer Einmalspritze sowie einem Milliporefilter (0,22 µm) steril filtriert.

- **Mutanolysin (5 U/µl):**

Das lyophilisierte Mutanolysin wurde mit 1 ml nukleasefreiem Wasser versetzt, per Hand gemischt und in Portionen von jeweils 200 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

- **Lysostaphin (2,5 U/µl):**

Für das Lysostaphin wurde analog zum Mutanolysin vorgegangen.

2.16.2.3 Lysieren der Pellets mit dem Invitrogen™ PureLink Kit

Die Pellets wurden mit 150 µl Lysozym, 10 µl Mutanolysin und 20 µl Lysostaphin versetzt, 5 s gevortext und bei 37 °C für 30 min auf einem Thermoblock inkubiert. Dann wurden 20 µl Proteinase K zugefügt und 3 s gevortext. Es folgte die Zugabe von 200 µl PureLink™ Genomic Lysis/Binding-Buffers und 3 s vortexen. Das Gemisch wurde bei

55 °C 30 min inkubiert. Abschließend wurden 200 µl Ethanol (96–100 %ig) zugesetzt und das Gemisch für 5 s gevortext.

2.16.2.4 Binden der DNA

Das Gesamtvolumen (640 µl) wurde auf den Filter des PureLink™ Tube pipettiert und bei 10.000 rpm, 1 min, RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entsorgt. Anschließend wurden 500 µl PureLink-Wash-Buffer 1 auf den Filter aufgetragen. Es folgte die erneute Zentrifugation bei 10.000 rpm, 1 min, RT. Nun wurde der Filter in ein neues Reagenzgefäß gestellt und nach Zugabe von 500 µl PureLink-Wash-Buffer 2 bei 13.000 rpm, 3 min, RT abzentrifugiert.

2.16.2.5 Eluieren der DNA

Der Filter wurde nun in ein steriles Eppendorfgefäß (1,5 ml) gestellt und die gebundene DNA mit 50 µl nukleasefreiem Wasser über 4 min gelöst. Es folgte die letzte Zentrifugation bei 13.000 rpm, 1 min, RT. Die eluierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.16.3 Lysieren der Pellets mit dem MO BIO® PowerLyzer Kit

Das Lysieren der Pellets mit dem PowerLyzer Kit beruht auf der mechanischen Destruktion bakterieller Zellwände mittels Glassbeads. Um auch kleine und widerstandsfähige Bakterien wie grampositive Kokken zu lysieren, wurde diese Methode entgegen der Herstellerangaben mit einer Enzymvorbehandlung des Invitrogen™ PureLink Systems kombiniert. Die Glassbeads des PowerLyzer Kits mit dem Invitrogen™ PureLink Kit zu kombinieren, war hingegen aufgrund des zu geringen Volumens nicht möglich.

Primär wurden die Pellets mit 170 µl Lysozym, 10 µl Mutanolysin und 20 µl Lysostaphin resuspendiert und per Hand gemischt. Es folgte eine 45-minütige Inkubation bei 37 °C. Das Gemisch wurde in spezielle Tubes mit Glassbeads und 550 µl Bead-Lösung (Solution) sowie 60 µl C1-Solution pipettiert und 5 s gevortext. Im Anschluss wurde die mechanische Behandlung im Fastprep MP™ bei 5 m/s für 45 s durchgeführt. Die Lösung wurde anschließend bei 10.000 g, 1 min, RT zentrifugiert, damit sich die Glassbeads aus der Lösung absetzen. Anschließend wurden 500 µl des Überstandes abgenommen und zusammen in einem neuen Reaktionsgefäß mit 250 µl C2-Solution versetzt, 5 s gevortext und 5 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10.000 g, 1 min, RT wurden 600 µl des Überstands in ein neues Tube gefüllt, 200 µl C3-Solution addiert sowie nach 2 s vortexen für 5 min bei 4 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 10.000 g, 1 min, RT wurden 750 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1.200 µl C4 Solution (vorher aufgeschüttelt) versetzt

und 5 s gevortext. Von der präparierten Lösung wurden nun in drei Durchläufen je 675 µl in ein Tube mit Spin-Filter (Kieselgelmembran) pipettiert und bei 10.000 g, 1 min, RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde stets verworfen. Nun wurden auf den Spin-Filter 500 µl C5 Solution aufgetragen und bei 10.000 g, 30 s, RT zentrifugiert. Es folgte das Verwerfen des Durchflusses und das Trocknen durch Zentrifugation bei 10.000 g, 1 min, RT. Der Filter mit der gebundenen DNA wurde in ein neues Tube gestellt und mit 100 µl nukleasefreiem Wasser eluiert. Die im Wasser gebundene DNA wurde bei 10.000 g, 30 s, RT abzentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

Die DNA-Konzentration aller Proben wurde mit dem Qubit™ bestimmt. Anschließend wurde bei den Ölziehproben ein DNA-Gemisch aus 80 Vol.-% Pellet (Aus dem MO BIO® PowerLyzer Kit) und 20 Vol.-% (Überstand aus Phenol-Chloroformextraktion) erstellt. Bei den Ziehproben ohne Überstände (NaCl-Ziehproben) wurde 20 Vol.-% nukleasefreies Wasser verwendet.

2.17 DNA-Messverfahren

Für die qualitative und quantitative Analyse der bakteriellen DNA wurden folgende Messverfahren verwendet:

- NanoDrop™
- Qubit™
- Agilent® 2100 Bioanalyzer

NanoDrop™: Der NanoDrop™ ist ein quantitatives Analysemessgerät. Es werden 1,6 µl der DNA-haltigen Lösung aufgetragen und im Programm auf das gesuchte Produkt (dsDNA) eingestellt. Das Verfahren basiert auf der Absorptionsmessung in einem Wellenbereich von 260–280 nm.

Qubit™: Der Qubit™ von Invitrogen™ ist ein Fluoreszenz-Spektrometer, das eine höhere Sensitivität gegenüber dem NanoDrop™ besitzt und bei größeren Probenmengen einen Zeitvorteil bietet. Dazu wird eine Qubit™-Working-Solution mit 199 µl Qubit™ Buffer und 1 µl Qubit™ Reagenz (für n = 1) hergestellt. Das Eichen des Gerätes erfolgte mit 190 µl der Qubit™ Working-Solution und 10 µl der beigefügten Standards 1 und 2. Für die Messproben wurden 195 µl der Working-Solution und 5 µl Probe verwendet. Alle Proben und Standards wurden in spezielle Qubit™ Tubes gefüllt und 3 s gevortext (Inkubationszeit 2 min bei RT).

Das Qubit™ Reagenz ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die DNA interkaliert und vom Spektrometer detektiert und quantifiziert werden kann. Für den Gerätestandard wurde das Programm dsDNA high sensitivity gewählt.

Agilent®: Agilent® 2100 Bioanalyzer ist ein System mit guter qualitativer und quantitativer Aussagekraft für DNA und RNA, das auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese basiert. Die Proben werden auf vorgefertigte Chips mit 12 Plätzen nach Herstellerangaben pipettiert. Diese wandern im elektrischen Feld hinsichtlich ihrer Größe und Konzentration in Mikrokapillaren und werden mit einem Sensor erfasst. Die Messung der Größe und Laufzeit erfolgt in Echtzeit. Dieses System bietet trotz des erheblichen Mehrkosten- und Zeitaufwandes exakte Messergebnisse sowie die Möglichkeit zur graphischen Darstellung.

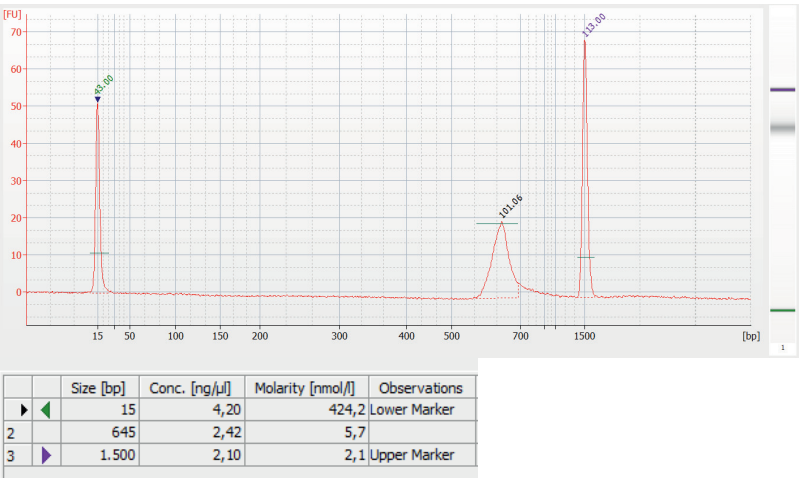


Abbildung 3: Agilent®, exemplarische Darstellung (Probe 1, V3–V4-Region nach Amplikon-II PCR)

2.18 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction) ist ein zentrales Element dieser Dissertation und geht auf Kary Mullis (1984) zurück. Sie dient der Vervielfältigung (Amplifikation) von Genabschnitten eines separierten DNA-Stranges. Ist der zu amplifizierende Bereich bzw. dessen Sequenz bekannt, verwendet man spezifische Oligonukleotide (Primer), die an diesen Genabschnitt binden und den zu replizierenden Bereich markieren (Forward-/Reverse-Primer). Eine hitzestabile DNA-Polymerase ist in der Lage vorhandene Nukleotide komplementär zur Originalsequenz in Richtung 5'–3' zu verbinden. Da in der *in vitro* Reaktion zelleigene Enzyme wie die Helikase (welche die DNA entwindet) oder die Topoisomerase (welche die superspiralisierte DNA schneidet) fehlen, werden diese Prozesse durch Solltemperaturen erreicht. Ein PCR-Zyklus besteht aus:

- Denature:** Bei 94–98 °C (Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen)
- Annealing:** Binden der Primer bei 55–68 °C (Primerabhängig) an den Einzelstrang
- Extension:** Verlängerung des von den Primern markierten Bereichs des Templates mittels Basenanbau durch die Polymerase (68–72 °C)

Die Bausteine (Desoxyribonukleotide) für die DNA-Produkte liegen in ausreichender Form im PCR-Mix vor, inklusive der DNA-Polymerase. Die Menge der PCR-Produkte steigt mit jedem Zyklus exponentiell an (Horn 2009). In dieser Dissertation wurden 8–30 Zyklen verwendet.

2.18.1 Materialien für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Tabelle 5: Ansatz der Prokaryonten PCR

PCR-Reaktion	PCR-Mix, Konzentrationen	1 x	Mastermix x × n
Mix	Phusion F-548	10 µl	10 µl × n
Primer 1	F 933 [10 pmol]	1 µl	1 µl × n
Primer 2	R 1407 [10 pmol]	1 µl	1 µl × n
H ₂ O	steril und nukleasefrei	6 µl	6 µl × n
Template		2 µl	
Gesamtvolumen		20 µl	18 µl/Tube

Mix: Phusion™ Flash PCR Master Mix F-548 (2X)

Primer 933 Forward: 5'-GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G-3'

Primer 1407 Reverse: 5'-GAC GGG CGG TGT GTA CAA G-3'

Gerät: Piko™ Thermal Cycler

Prokaryonten PCR

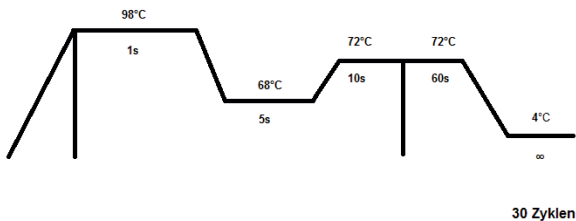


Abbildung 4: Programm für die Prokaryonten PCR

2.18.2 Amplikon-I PCR V4-Region

Tabelle 6: Ansatz der Amplikon-I PCR für die V4-Region

PCR-Reaktion	PCR-Mix, Konzentrationen	1 x	Mastermix x × n
Mix	KAPA HiFi Mix	12,5 µl	12,5 µl × n
Primer 1	F V4 [100 pmol]	0,5 µl	0,5 µl × n
Primer 2	R V4 [100 pmol]	0,5 µl	0,5 µl × n
H ₂ O	steril und nukleasefrei	9 µl	9 µl × n
Template	Eingestellt: 5 ng/µl Qubitwert	2,5 µl	
Gesamtvolumen		25 µl	22,5 µl/Tube

Mix: KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (2X)

Primer V4 Forward: 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3'

Primer V4 Reverse: 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT-3'

Gerät: GeneAmp® PCR System 9700

Amplikon I PCR

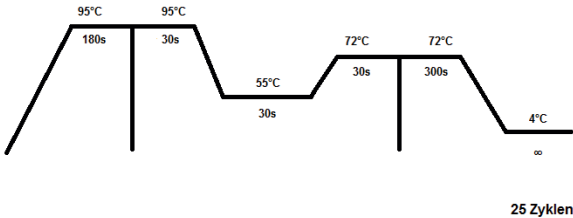


Abbildung 5: Programm für Amplikon-I PCR

2.18.3 Amplikon-I PCR V3–V4-Region

Tabelle 7: Ansatz der Amplikon-I PCR für die V3–V4-Region

PCR-Reaktion	PCR-Mix, Konzentrationen	1 x	Mastermix x × n
Mix	KAPA HiFi Mix	12,5 µl	12,5 µl × n
Primer 1	F V3/V4 [100 pmol]	0,5 µl	0,5 µl × n
Primer 2	R V3/V4 [100 pmol]	0,5 µl	0,5 µl × n
H₂O	steril und nukleasefrei	9 µl	9 µl × n
Template	Eingestellt: 5 ng/µl Qubitwert	2,5 µl	
Gesamtvolumen		25 µl	22,5 µl/Tube

Mix: KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (2X)

Primer V3/V4 Forward: 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC QGC AG-3'

Primer V3/V4 Reverse: 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3'

Gerät: GeneAmp® PCR System 9700

Vor der Amplikon-I PCR wurden alle Proben mit dem Qubit™ System gemessen und simultan auf 5 ng/µl verdünnt.

Amplikon I PCR

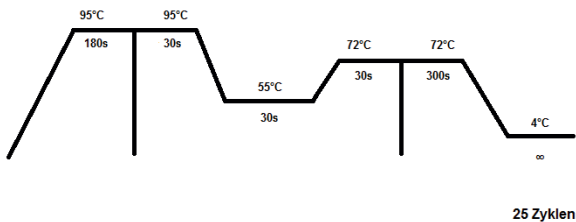


Abbildung 6: Programm für Amplikon-I PCR

2.18.4 Amplikon-II PCR V3–V4/V4-Region ohne Mastermix

Tabelle 8: Ansatz der Amplikon-II PCR für die V3–V4/V4-Regionen

PCR-Reaktion	PCR-Mix, Konzentrationen	1 x
Mix	KAPA HiFi Mix	25 µl
Primer 1	F Indexprimer 1	5 µl
Primer 2	R Indexprimer 2	5 µl
H ₂ O	steril und nukleasefrei	10 µl
Template	Eingestellt: 5 ng/µl Qubitwert	5 µl
Gesamtvolumen		50 µl

Mix: KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (2X)

Gerät: GeneAmp® PCR System 9700

Tabelle 9: Indexprimer für die Amplikon-II PCR

Index 1	Sequenz 1	Index 2	Sequenz 2
N716	ACTCGCTA	S502	CTCTCTAT
N718	GGAGCTAC	S503	TATCCTCT
N719	GCGTAGTA	S505	GTAAGGAG
N720	CGGAGCCT	S506	ACTGCATA
N721	TACGCTGC	S507	AAGGAGTA
N722	ATGCGCAG	S508	CTAAGCCT
N723	TAGCGCTC	S510	AAGGAGTA
N724	ACTGAGCG		
N726	CCTAAGAC		
N727	CGATCAGT		
N728	TGCAGCTA		
N729	TCGACGTC		

Amplikon II PCR

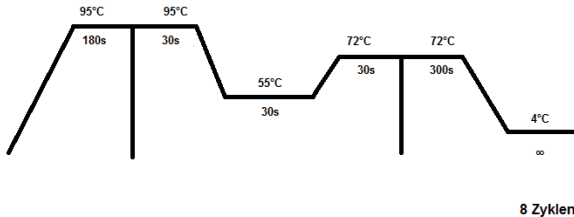


Abbildung 7: Programm für Amplikon-II (Index-PCR)

Bei der Amplikon-II (Index-PCR) werden die V3–V4/V4-Primer durch spezifische Index-Primer ersetzt. Durch geringste Basenabweichungen der Primer ist es so später möglich, die Kombination der Indexprimer den jeweiligen Proben in einem Pool zuzuordnen.

2.19 Auftrag der PCR-Produkte auf ein 1 %iges Agarose-Gel

Je 16 µl des PCR-Produktes wurden in ein autoklaviertes 1,5 ml Reagenzgefäß gefüllt und per Hand mit 4 µl Ficoll® 400 25 % (Auftragspuffer aus Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer+Farbstoff) vermischt. Zusätzlich wurde bei der Gelelektrophorese eine Positivkontrolle (*E. coli*-DNA), Negativkontrolle (H₂O) und ein Molekulargewichtsmarker verwendet, um Kontaminationen auszuschließen und die Größe der PCR-Produkte bestimmen zu können. Die Kammer wurde anschließend mit 150 V, 250 mA, 1 h unter Gleichstrom gesetzt. Die DNA bewegt sich unterschiedlich weit (nach Größe der Basenpaare) im elektrischen Feld. Die Lauffelder wurden dann mit einem Skalpell herausgetrennt und mit UV-Licht sichtbar gemacht.

2.19.1 Ansatz der Ladder (1 kb DNA-Marker) 1000 bp

- 20 µl DNA Ladder (1 kb Plus)
- 40 µl 1 x Tris-EDTA-Puffer
- 100 µl 25 % Ficoll® 400 (25 g in 100 ml H₂O mit Bromphenolblau)
- 240 µl H₂O (steril und nukleasefrei)

2.19.2 Ansatz des 10x TBE (Tris-Borat-EDTA) Puffers

Für das Ansetzen der Stocklösung wurden folgende Chemikalien in einer Schott-Laborglasflasche angesetzt, gemischt und anschließend autoklaviert:

- 108 g Tris (Trishydroxymethylaminomethan 89 mM)
- 55 g Borsäure (2 mM)
- 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,3/89 mM)
- Aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf 1000 ml

2.20 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Das MALDI-TOF (Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization/time of flight) ist ein 1985 von Karas *et al.* (Karas *et al.* 1985) modifiziertes System zur Analyse von Molekülen, welche mit einem Laser ionisiert und mittels Massenspektrometrie entsprechend ihrer Flugzeit analysiert und identifiziert werden können. Dabei dient das Bakterium *E. coli* als Referenz. Die Proben zur Speziesidentifizierung mittels MALDI-TOF MS wurden freundlicherweise von einer erfahrenen, technischen Assistentin des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der JLU Gießen analysiert.

2.21 Färbemethoden für die Mikroskopie

Für die erstellten Abbildungen unter mikroskopischer Ansicht mit dem Fluoreszenzmikroskop Biozero, BZ-8000 wurde ein Objektiv mit 60-facher Vergrößerung und folgende Färbemethoden verwendet:

- Giemsa-Färbung 1:4, 1:4 mit Methanol fixiert (auf dem Objektträger)
- Giemsa-Färbung 1:4 ohne Methanol fixiert (nativ)
- Nativpräparat (ohne Färbung)

Die Giemsa-Romanowsky Färbung ist eine Differentialfärbung, welche besonders die DNA des Zellkerns eukaryotischer Zellen und Bakterien purpurrot anfärbt. Sie besteht konzentrationsabhängig aus: Azur A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat, Methylenblauchlorid, Glycerin und wahlweise Methanol (Zipfel *et al.* 1981). In dieser Dissertation wurde die Giemsa-Färbung mit und ohne Methanol verwendet, da das Methanol amphiphil ist und das Öl aus den Proben herauslösen kann.

2.22 Aufreinigung der Amplikon PCR-Produkte mittels Agencourt AMPure XP®

Das Agencourt AMPure XP® System dient der Aufreinigung von PCR-Produkten, die größer als 100 bp sind, mittels magnetischer Beads und Ethanol (SPRI®-Technologie). Ziel ist die Entfernung von freien dNTPs, Primern, Primerdimeren, Salzen und weiteren Kontaminationen. Das System erfordert das strikte Einhalten der Herstellerangaben sowie stets das bei jedem Vorgang frische Ansetzen von 80 %igem Ethanol. Das System beruht auf:

- 1: Binden der Amplikons an die magnetischen Beads
- 2: Fixieren der beladenen Beads an einen Magneten
- 3: Waschen der Beads mittels 80 %igem Ethanol (zweifach)
- 4: Eluieren der Amplikons und Entfernen der Beads

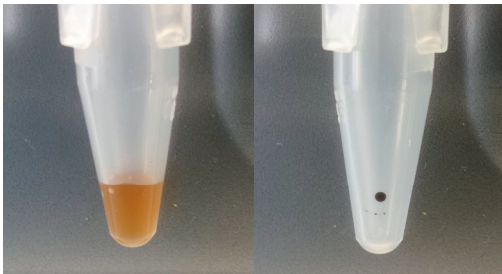


Abbildung 8: Binden der mit DNA beladenen Beads an einen Magneten

2.22.1 Erste AMPure-Aufreinigung

Die erste AMPure-Aufreinigung fand nach der Amplikon-I PCR statt. Die Proben wurden von -20 °C auf Raumtemperatur gebracht und 25 µl in ein DNA-LoBind Tube (1,5 ml) überführt. Zu den Proben wurden 20 µl AMPure XP® Beads hinzugefügt sowie 10 × resuspendiert und gemischt. Es folgte eine 5-minütige Inkubationszeit. Anschließend wurde das Tube auf den Magnetständer gestellt und 2 min dort belassen (Abb. 8). Das nun klare Medium wurde vorsichtig entfernt und die Proben in dieser Position zweifach mit 200 µl frisch angesetztem 80 %igem Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde anschließend restlos entfernt und die Tubes für 10 min offen gelassen, damit sich etwaige Ethanolrückstände verflüchtigen konnten. Im Folgenden wurden die Tubes vom magnetischen Ständer genommen und die Beads mit 52,5 µl 10 mM Tris, pH 8,5 Puffer resuspendiert und gemischt. Es folgte eine 2 minütige Inkubationszeit.

Anschließend wurden die Proben erneut für 2 min auf den magnetischen Ständer gestellt. Die im Puffer gelöste und gereinigte DNA (50 µl) wurde in ein separates Tube überführt. Die Proben wurden nun 1:30 verdünnt, mit dem Agilent® System gemessen und auf einen aussagekräftigen PCR-Peak hin überprüft.

2.22.2 Zweite AMPure-Aufreinigung

Die zweite Ampure-Aufreinigung fand nach der Amplikon-II (Index-PCR) statt. Die Proben wurden von -20 °C auf Raumtemperatur gebracht und 50 µl in ein DNA-LoBind Tube (1,5 ml) überführt. Zu den Proben wurden 56 µl AMPure XP® Beads hinzugefügt, sowie 10 Mal resuspendiert und gemischt. Es folgte eine 5-minütige Inkubationszeit. Anschließend wurde das Tube auf den Magnetständer gestellt und 2 min dort belassen (Abb. 8). Das nun klare Medium wurde vorsichtig entfernt und die Proben in dieser Position zweifach mit 200 µl frisch angesetzttem 80 %igen Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde anschließend restlos entfernt und die Tubes für 10 min offen gelassen, damit sich Rückstände von Ethanol verflüchtigen konnten. Jetzt wurden die Tubes vom magnetischen Ständer genommen und die Beads mit 27,5 µl 10 mM Tris Puffer pH 8,5 resuspendiert und gemischt. Es folgte eine 2-minütige Inkubationszeit. Anschließend wurden die Proben erneut 2 min auf den magnetischen Ständer gestellt. Die im Puffer gelöste und gereinigte DNA (25 µl) wurde in ein separates Tube überführt. Die Proben wurden nun 1:30 verdünnt mit dem Agilent®-System gemessen und auf eine Konzentration von 2 nM verdünnt. Es wurde ein Probenpool aller 81 Proben summiert aus je 5 µl (insgesamt 405 µl) erstellt.

2.23 Next-Generation Sequencing (NGS) mit dem Illumina® MiSeq™

Ziel dieser Dissertation ist die qualitative und quantitative, genomische Analyse des 16S rDNA-Gens aller bakteriellen Spezies aus den aufgearbeiteten Proben (orales Mikrobiom).

Die Funktionsweise besteht in der Detektion von Produkten einer DNA-Polymerase, die fluoreszenzmarkierte dNTPs (eines Templates) synthetisiert. Ein Sensor erkennt die eingebauten Nukleotide während eines Zyklus und errechnet die Basenabfolge von Millionen simultan replizierter DNA-Stränge. Diese Basenabfolge (Reads) wird mit einer digitalen Bibliothek verglichen und einem Bakterium sehr genau zugeordnet. Dabei reicht es aus, lediglich ein Teilstück des bakteriellen Genoms (16S rDNA, welche für die 16S rRNA codiert), das mit Primern markiert wurde, zu amplifizieren. Es können parallel bis zu 96 Proben untersucht werden, wobei jeder Probe zur Unterscheidung eine individuelle Kombination aus Index-Primern zugeordnet werden muss. Es stehen bei dieser Dissertation zwei verschiedene Genabschnitte der

Amplifikation zur Verfügung. Die Primer binden an der hoch konservierten Region der V3–V4- oder V4-Bereiche der 16S rDNA. So wird gewährleistet, dass die Primer zur Replikation aller Bakterienspezies geeignet sind. Unterscheiden kann man die Bakterien durch die variablen Bereiche, welche hochamplifiziert werden. Die 16S rDNA besteht aus bis zu 1.542 Basen und kodiert für die Ribosomen aller Bakterien, welche der Proteinbiosynthese dienen. Anhand der unterschiedlichen Basenabfolgen in den variablen Regionen können Familien und Gattungen voneinander unterschieden werden. Sie besteht aus sechs Fragmenten bzw. neun hypervariablen Regionen: (Yarza *et al.* 2014)

Tabelle 10: 16S rDNA Taxonomie (Yarza *et al.* 2014)

Fragment R	Region V	Basenposition
R1	V1–V2	1–250
R2	V3	251–500
R3	V4	501–750
R4	V5–V6	751–1.050
R5	V7–V8	1.051–1.300
R6	V9	1.301–1.542



Abbildung 9: Illumina® MiSeq™

2.23.1 Vorbereitungen zur Sequenzierung mit dem Illumina® MiSeq™

Vor der Sequenzierung muss der Probenpool (Amplikon-Library) und die PhiX-Kontrolle frisch mit Natronlauge denaturiert werden. Dazu wurden 5 µl der Amplikon Library mit 5 µl 0,2 N (M) NaOH gemischt, vorsichtig gevortex und bei 280 g, 60 s, RT zentrifugiert sowie anschließend 5 min inkubiert. Ziel ist die Separation der Doppelstrang-DNA durch Denaturierung in einzelsträngige DNA. Anschließend wurde die Amplikon-Library mit 990 µl HT1-Puffer versetzt. Das Resultat ist eine 20 pM Library, welche in diesem Fall auf 3 pM mit dem HT1-Puffer verdünnt wurde, um eine optimale Cluster-Generation zu erreichen. Zur Denaturierung der vorhandenen 4 nM PhiX-Library wurden analog zur Amplikon-Library 5 µl der PhiX-Kontrolle mit 5 µl 0,2 N (M) NaOH gemischt, gevortex und bei 280 g, 60 s, RT zentrifugiert sowie anschließend 5 min inkubiert. Um eine 20 pM PhiX-Library zu generieren, wurde das Probenvolumen mit 990 µl HT1-Puffer versetzt. Abschließend wurde die 20 pM PhiX-Library (375 µl) mit 225 µl HT1-Puffer verdünnt. Das Resultat war eine 12,5 pM PhiX-Library-Kontrolle, welche die Qualität der Sequenzierung detektiert. Anschließend

wurden die Amplikon-Library (3 pM) und PhiX-Library (12,5 pM) im Verhältnis 540 µl zu 60 µl zusammengefügt. Das Gerät an sich wird einem Waschprogramm unterzogen, die zu beladende Reagenzkartusche auf Raumtemperatur gebracht sowie die Flow-Cell gereinigt und in die Hauptapparatur inseriert. Das gesamte Probenvolumen (600 µl) wurde in die vorgesehene Kammer der Kartusche pipettiert und der Sequenziervorgang gestartet. Dieser umfasste 251 Zyklen bei 45 h Laufzeit. Als Reagenz wurde das herstellerspezifische v2 Kit verwendet.

2.23.2 Aufbau des MiSeq™ NGS-Systems

Library Preparation: Der Probenpool (Library: DNA-Fragmente) wird mit 0,2 N (M) Natronlauge denaturiert sowie mit einer 12,5 pM PhiX-Kontrolle zur Identifikation versetzt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Konzentration aller Proben zuvor mit dem Agilent®-System gemessen und simultan mit nukleasefreiem Wasser auf 2 nM verdünnt wurden. Die Konzentration des Probenpools wurde abschließend auf 3 pM (HT1-Puffer) eingestellt, um eine Überlastung der Flow-Cell vorzubeugen. An diesem Punkt startet die PCR mit insgesamt 251 Zyklen.

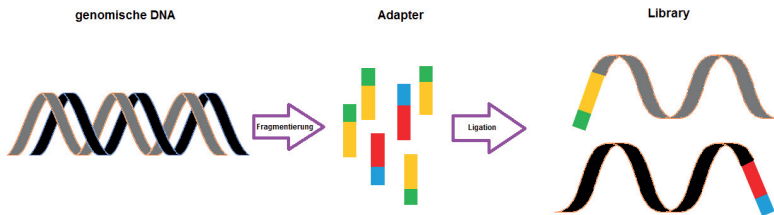


Abbildung 10: Library Preparation modifiziert nach Illumina®

Cluster Generation: An der Oberfläche der Flow-Cell befinden sich Oligonukleotide, die komplementär mit den Primern der Proben sind. Dort können sich diese folglich anlagern. Jedes Fragment wird amplifiziert und bildet über die Brückenamplifikation clonale Cluster. Ist die Cluster Generation abgeschlossen, werden die gebildeten Fragmente sequenziert.

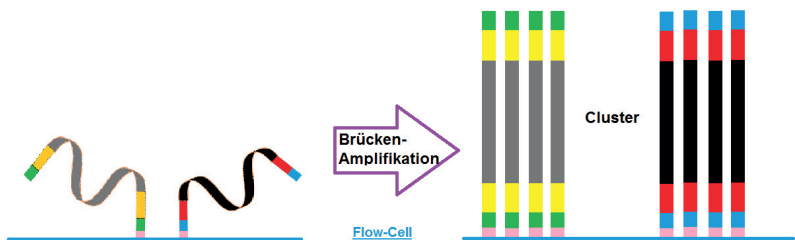


Abbildung 11: Cluster Generation modifiziert nach Illumina®

Sequencing: Auf Grundlage der Illumina® SBS-Technology (sequencing by synthesis) detektiert der MiSeq™ den Einbau der Basen in Echtzeit (base per base sequencing).

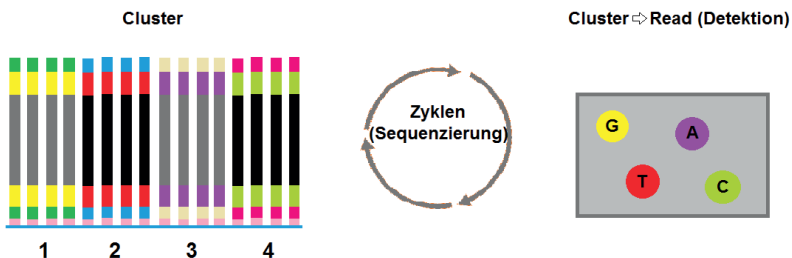


Abbildung 12: Sequencing modifiziert nach Illumina®

Data Analysis: Die identifizierten Sequenzen werden mit den derzeit bekannten aus einer Datenbank (QIIME™/mothur) abgeglichen. Zusätzlich wird die Anzahl der Reads erfasst. Die Sensitivität liegt bei ca. 85 %. Die Identifikation der Bakterien erfolgt bis zur Familie zuverlässig. Bei der Bestimmung der Spezies stößt das NGS aufgrund der limitierenden Länge des replizierten DNA-Fragments an seine Grenzen.

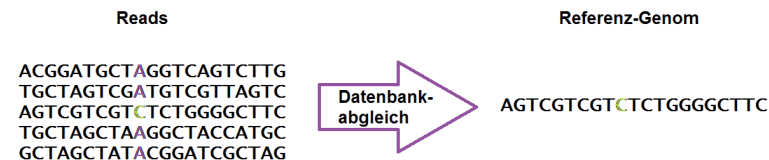


Abbildung 13: Data Analysis modifiziert nach Illumina®

3 Ergebnisse

Zunächst werden Ergebnisse aus Vorversuchen als Grundlage zur Etablierung der DNA-Extraktion aus Öl-Emulsionen dargestellt. Die ersten Fragestellungen waren: Können Öl-Speichel-Emulsionen ausplattiert und kultiviert werden und sterben die Bakterien in zeitlichen Abständen ab? Hierzu wurde eine Ölziehprobe auf COLS und CHOCV, im zeitlichen Abstand von 1 h, 5 h und 26 h bei Raumtemperatur ausplattiert und für 24 h (Kapitel 2.4) inkubiert.



Abbildung 14: Ölziehprobe nach 1 h, 5 h, 26 h (COLS)

Als Resultat führte der zeitliche Rahmen zwischen Probenentnahme und deren Verarbeitung zu keinem Einfluss auf die Kultivierbarkeit der darin vorhandenen Bakterien. Da auf den Schafblut-Agarplatten eine große bakterielle Vielfalt anzüchtbar ist, wurde zusätzlich untersucht, wie viele Bakterien in Speichel bzw. Öl-/NaCl-Ziehproben vorhanden sind. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe von 10^0 – 10^{-7} (je 100 μ l) erstellt (Kapitel 2.6).

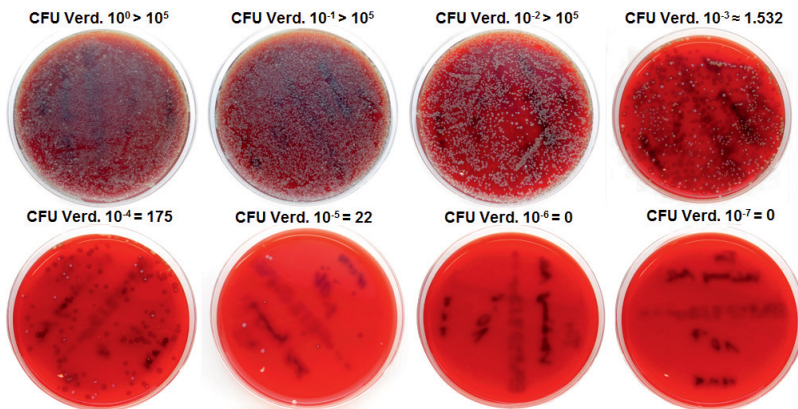


Abbildung 15: Verdünnungsreihe NaCl-Ziehprobe: CFU Verd. 10^0 – 10^{-7} (COLS)

Dabei ist festzustellen, dass sowohl bei NaCl (0,9 %) als auch bei Öl die letzte Verdünnungsstufe, in welcher Kolonien gefunden werden konnten 10^{-6} sowie bei konzentriertem Speichel der Faktor 10^{-7} betrug. Bei diesem Vergleich wurde simultan festgestellt, dass beim Ölziehen 30 % (ca. 3 ml) mehr Speichel produziert wurde.

3.1 Identifikation der isolierten Bakterien auf COLS, MacConkey- und SAB-Agar mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Bei einer geeigneten Verdünnungsstufe von 10^{-4} wurden zur Differentialdiagnostik unterschiedliche Kolonien von allen Probanden entnommen und ein Verdünnungsausstrich durchgeführt. Die so separierten Kolonien wurden der MALDI-TOF Massenspektrometrie unterzogen. Dabei wurden folgende Keime isoliert:

Tabelle 11: Keimbestimmung der oralen Flora mittels MALDI-TOF MS

Keim/Pilz	Konfidenzwert	Agar
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	50,0	Schafblut-Agar
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	99,9	Schafblut-Agar
<i>Actinomyces radingae</i>	99,9	Schafblut-Agar
<i>Actinomyces viscosus</i>	99,9	Schafblut-Agar
<i>Candida albicans</i>	99,9	Sabouraud-Dextrose-Agar
<i>Eikenella corrodens</i>	27,7	Schafblut-Agar
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	99,8	Schafblut-Agar
<i>Gemella sanguis</i>	99,9	Schafblut-Agar
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	99,9	Schafblut-Agar
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99,9	MacConkey-Agar
<i>Leifsonia aquatica</i>	95,7	Schafblut-Agar
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99,8	Schafblut-Agar
<i>Micrococcus luteus</i> / <i>lylae</i>	49,9	Schafblut-Agar
<i>Neisseria mucosa</i>	50,0	Schafblut-Agar
<i>Neisseria subflava</i>	50,0	Schafblut-Agar
<i>Nocardia asteroides</i>	36,2	Schafblut-Agar
<i>Prevotella denticola</i>	99,9	Schafblut-Agar
<i>Prevotella disiens</i>	46,4	Schafblut-Agar

Ergebnisse

<i>Prevotella melaninogenica</i>	99,9	Schafblut-Agar
<i>Propionibacterium avidum</i>	35,9	Schafblut-Agar
<i>Rothia mucilaginosa</i>	99,9	Schafblut-Agar
<i>Serratia liquefaciens</i>	99,9	MacConkey-Agar
<i>Serratia marcescens</i>	99,9	MacConkey-Agar
<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9	Schafblut-Agar
<i>Staphylococcus warneri</i>	99,4	Schafblut-Agar
<i>Streptococcus constellatus</i>	99,9	Schafblut-Agar
<i>Streptococcus mitis / oralis</i>	99,9	Schafblut-Agar
<i>Streptococcus parasanguis</i>	99,9	Schafblut-Agar
<i>Streptococcus salivarius</i>	99,9	Schafblut-Agar
<i>Streptococcus vestibularis</i>	99,9	Schafblut-Agar
<i>Veillonella parvula</i>	99,9	Schafblut-Agar

Klebsiella, *Micrococcus* und *Serratia* sind dabei die einzigen Bakteriengattungen, die nicht durch die Sequenzierung identifiziert bzw. verifiziert werden konnten. Es wurden alle gefundenen Bakterien – auch mit einem Konfidenzwert (Wahrscheinlichkeitswert) von unter 50 % – zur Vollständigkeit und zum Vergleich mit dem NGS aufgeführt, da auch von dieser Methode sämtliche generierten Reads in dieser Arbeit dokumentiert sind.

3.1.1 Vergleich NaCl- und Ölziehprobe auf SAB-Agar

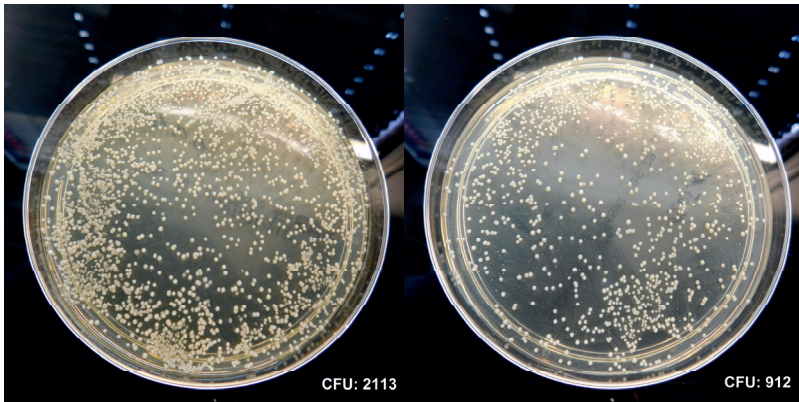


Abbildung 16: *Candida albicans* (SAB-Agar), NaCl (0,9 %) vorher/nachher, Proband C

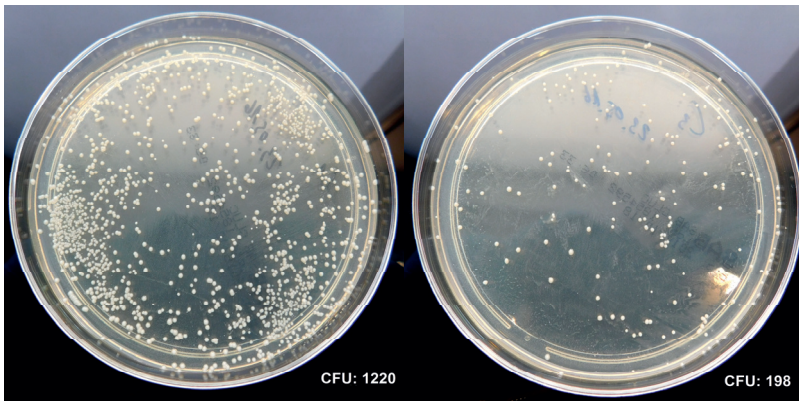


Abbildung 17: *Candida albicans* (SAB-Agar), Öl vorher/nachher, Proband C

Diese exemplarische Darstellung stammt von Proband C, da nur bei dieser Person eine ausreichend große Menge an *Candida albicans* nachweisbar war. Es wurden je 100 µl Probe ausplattiert. In dieser Einzelbetrachtung wurde beim NaCl-Ziehen eine Reduktion von ~57 % und beim Ölziehen eine Reduktion von ~84 % erzielt. *Candida albicans* war dabei der einzige Pilz, welcher kultiviert werden konnte.

3.1.2 Vergleich NaCl- und Ölziehprobe auf MacConkey-Agar

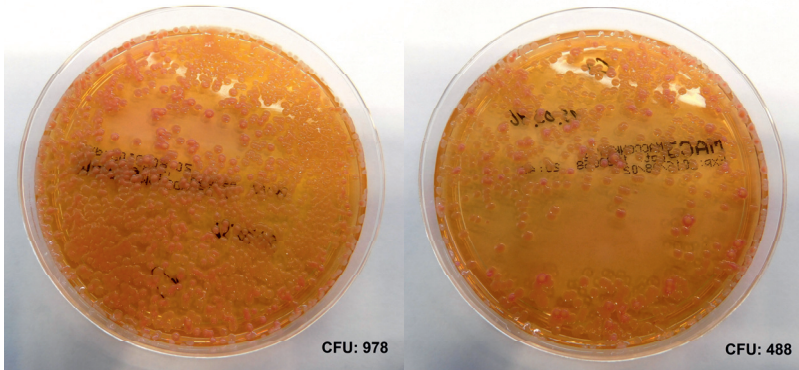


Abbildung 18: *Klebsiella oxytoca* (MAC-Agar), NaCl (0,9 %) vorher/nachher, Proband C

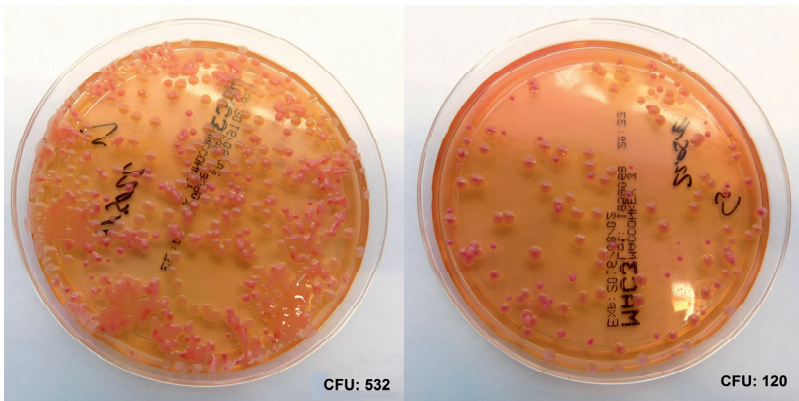


Abbildung 19: *Klebsiella oxytoca* (MAC-Agar), Öl vorher/nachher, Proband C

Diese exemplarische Darstellung stammt von Proband C, da nur bei dieser Person eine ausreichend große Menge an *Enterobacteriaceae* gefunden wurde. Es wurden je 100 µl Probe ausplattiert. In dieser Einzelbetrachtung wurde beim NaCl-Ziehen eine Reduktion von ~50 % und beim Ölziehen eine Reduktion von ~77 % erzielt.

3.1.3 Vorversuche zur DNA-Extraktion aus Öl

Da sich bei einer Öl/Speichel-Emulsion stets eine Phasentrennung ergibt, musste eine Möglichkeit etabliert werden, um bakterielle DNA aus Öl extrahieren zu können.

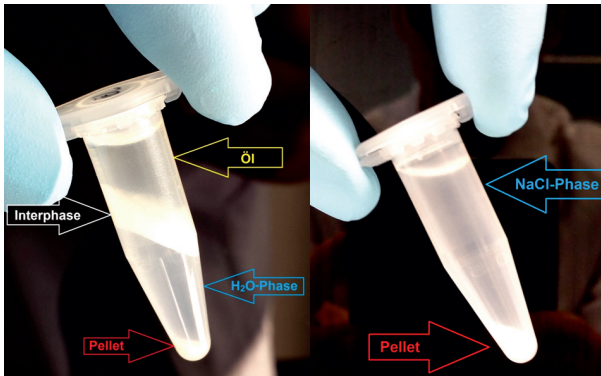


Abbildung 20: Ölziehprobe (links), NaCl-Ziehprobe (rechts) zentrifugiert, 1,5 ml, 13.300 rpm, 15 min, RT

Hierzu wurden 200 µl Öl mit 100 µl NaCl (0,9 %) sowie einer Kolonie *S. aureus* gemischt und gevortext. Die entstandene Stocklösung wurde in drei Reaktionsgefäße aufgeteilt und je 100 µl NaCl (0,9 %) hinzupipettiert. Reaktionsgefäß 1 wurde mit 200 µl 70 %igem Ethanol, Reaktionsgefäß 2 mit 100 %igem Ethanol und Reaktionsgefäß 3 mit 200 µl Chloroform:Isoamylalkohol 24:1 versetzt.

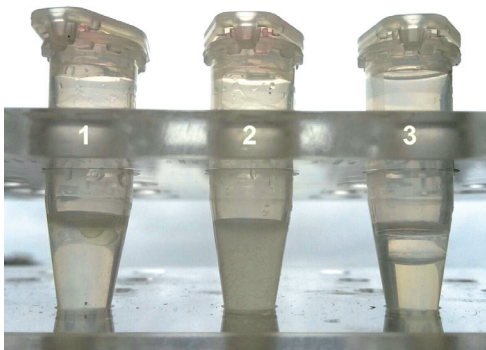


Abbildung 21: DNA-Extraktion aus Öl mittels 70 %igem Ethanol (1), 100 %igem Ethanol (2), Chloroform:Isoamylalkohol 24:1 (3)

Nur in Reaktionsgefäß 3 wurde eine saubere Phasentrennung erzielt, die eine standardisierte DNA-Extraktion ermöglicht. Anschließend wurden aus Reaktionsgefäß drei 30 µl auf eine Schafblutagarplatte ausplattiert und bei 37 °C, für 24 h bei 5,0 % CO₂ inkubiert. Das Resultat war, dass sämtliche *S. aureus*-Keime abgestorben sind und nicht mehr kultivierbar waren, da die Bakterien durch das Phenol-Chloroform-Gemisch lysieren und die chromosomale DNA freigesetzt wird (Chomczynski und Sacchi 1987).

3.1.4 PCR mit den DNA-Produkten aus der Phenol-Chloroform-Extraktion:

Die Fragestellung war nun, ob bakterielle DNA aus einer Ölprobe mittels Phenol-Chloroform extrahiert werden kann und eine Prokaryonten-PCR mit dem gewonnenen Produkt überhaupt gelingt. Hierzu wurden die Öl-Bakterien-Gemische jeweils zusätzlich mit 10 µl *E. coli*-DNA zur Verifizierung gespickt und eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Isopropanolfällung durchgeführt. Danach wurde mit den DNA-Extrakten eine Prokaryonten-PCR angefertigt und der Ertrag auf einem 1% Agarosegel dokumentiert.

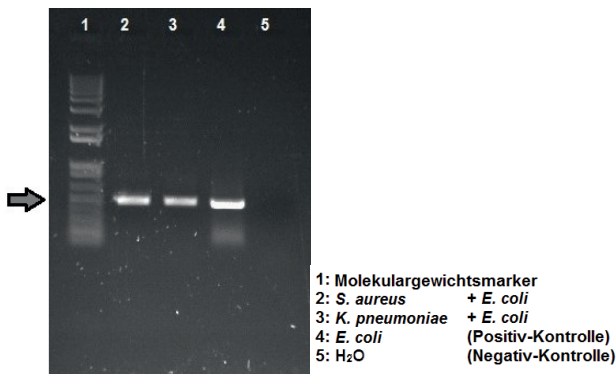


Abbildung 22: PCR mit Extrakten aus Phenol-Chloroform-Extraktion

Das Ergebnis war eine jeweils singuläre Bande bei 474 bp (Abb. 22). Die DNA-Extraktion aus dem ölhaltigen Überstand mit anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion und Isopropanolfällung ist für die PCR-Reaktion geeignet, da sich ein deutliches Amplifikat ohne Verunreinigungen zeigt.

3.1.5 DNA-Extraktion aus Öl-Pellets

Es wurden Suspensionen aus 300 µl bakterieller ÜNK (OD₆₀₀) von *S. aureus* und *K. pneumoniae* mit 300 µl Öl angefertigt. Die aus den Öl-Suspensionen heraus

zentrifugierten und isolierten Pellets wurden mit verschiedenen Kits zur DNA-Isolierung behandelt. Im Folgenden wurde nach Herstellerangaben mit dem PureLink-Kit vorgegangen. Die extrahierte DNA-Menge wurde mit dem NanoDrop™ bestimmt und betrug bei 134 ng/μl für *S. aureus* und 185 ng/μl für *K. pneumoniae* in der Öl-ÜNK-Suspension. Nun sollte auch hier überprüft werden, wie sich das Resultat einer Prokaryonten-PCR aus den Ölextrakten auf dem 1 %igen Agarosegel im Vergleich zur reinen Übernachtskultur (600 μl) bei OD₆₀₀ darstellt. Um ein Überladen der PCR vorzubeugen, wurden die Proben zuvor 1:10 verdünnt. Das Resultat waren gleichmäßige DNA-Banden bei 474 bp und ein leichter Primer-Schleier bei der Negativkontrolle (Abb. 23/Spur 6).

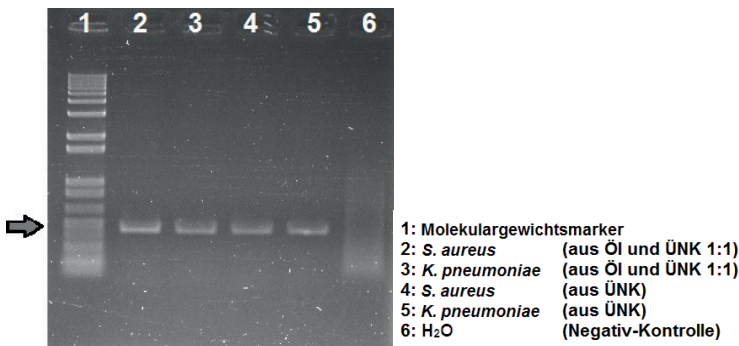


Abbildung 23: Ölpellet, DNA-Extraktion

Das Ergebnis zeigt, dass es möglich ist, saubere DNA aus einer Ölziehprobe in Kombination aus Überstand und Pellet zu extrahieren.

3.1.6 DNA-Extraktion aus einer Ölziehprobe

Die nun grundlegend etablierte Technik wurde auf eine Probanden-Ölziehprobe angewendet. Es wurde ebenfalls das Invitrogen™-Kit verwendet. Dabei wurden mit dem NanoDrop™ für Pellet und Überstand folgende DNA-Werte gemessen.

Ölziehpellet: 121,8 ng/μl

Überstand: 49,0 ng/μl

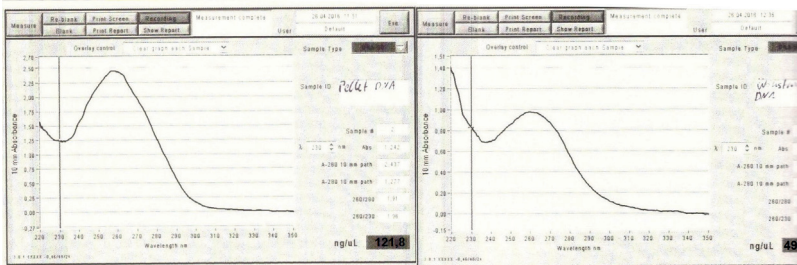


Abbildung 24: DNA-Gehalt Ölziehpellet (links)/Überstand (rechts)

Zur Verifizierung wurde auch mit diesen Proben eine Prokaryonten-PCR durchgeführt und die Resultate auf einem 1 %igen Agarosegel dokumentiert.

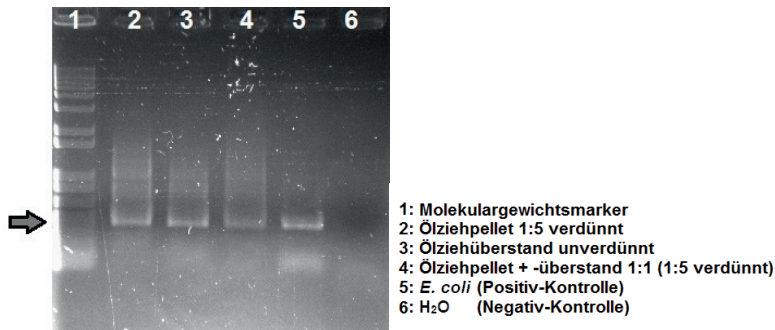


Abbildung 25: Ölziehpellet, PCR

Als Ergebnis konnte quantitativ viel DNA bei 474 bp aber auch ein großer Anteil unspezifische Produkte detektiert werden. Das Invitrogen™ PureLink-Extraktionskit liefert zwar aussagekräftige Werte, jedoch beruht das System auf der chemischen Lyse von Bakterien mittels Enzymen. Folglich ist die Frage, ob auch alle relevanten Bakterien mit ihren unterschiedlichen Morphologien und Zellwandeigenschaften mit diesem System extrahiert werden können. Auf dieser Annahme wurde eine Kombination aus zwei grundlegend verschiedenen Extraktionskits der Firmen MO BIO® mit Glassbeads (mechanische Lyse) und PureLink™ (enzymatische Lyse mit Lysozym, Mutanolysin und Lysostaphin) verwendet und etabliert.

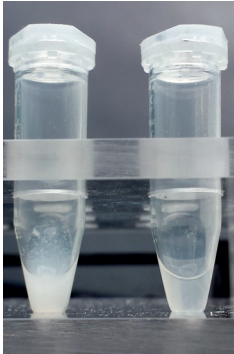
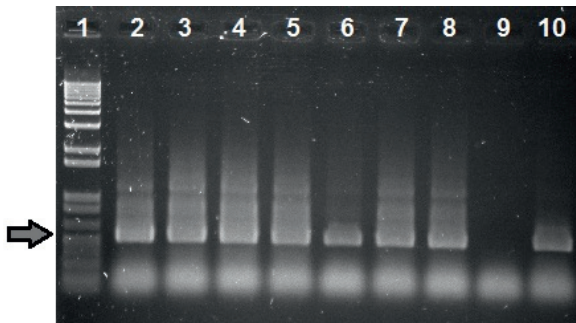


Abbildung 26: MO BIO® PowerLyzer-Kit links mit Enzymen/rechts ohne Enzyme

Es wurden variable Kombinationen aus Pellets mit verschiedenen Methoden extrahiert, eine Amplikon-I PCR für die V3–V4-Region durchgeführt und die Produkte auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetragen.



- 1: Molekulargewichtsmarker
- 2: Ölziehpellet, PowerLyzer + Enzyme + Puffer
- 3: Ölziehpellet, PowerLyzer - Enzyme + Puffer
- 4: Ölziehpellet, PureLink
- 5: Ölziehpellet, PowerLyzer + Enzyme + Puffer + Ölziehüberstand 1:1
- 6: Speichelpellet, PowerLyzer + Enzyme + Puffer
- 7: Ölziehpellet, PowerLyzer - Enzyme - Puffer
- 8: Speichelpellet, PureLink
- 9: H₂O (Negativ-Kontrolle)
- 10: *E. coli* (Positiv-Kontrolle)

Abbildung 27: Verschiedene Extraktionsmethoden, Vergleich nach Amplikon-I PCR

Es entstanden bei allen Kombinationen ähnlich intensive PCR-Produkte bei 550 bp. Die Wolken im unteren Bereich entsprechen den im Überschuss vorhandenen Primern. Das Protokoll schreibt einen Primerüberschuss vor, jedoch werden unerwünschte Produkte durch die spätere AMPure®-Aufreinigung (Kapitel: 2.22) entfernt. Aufgrund dieses Resultats wurde entschieden, für den Hauptversuch bei zentrifugierten

Bakterienpellets die Methode Nr. 2 bzw. Nr. 6 zu wählen, da hier die Chance auf eine größtmögliche Vielfalt an DNA-Extrakten zu generieren am wahrscheinlichsten ist. Im Unterschied zu einer reinen Speichel- oder NaCl-Ziehprobe, wurde bei einer Ölziehprobe die extrahierte DNA (Kapitel: 2.16.3) auf ein Konzentrationsverhältnis von 80 % Pellet-DNA und 20 % DNA aus der Phenol-Chloroform-Extraktion (Kapitel: 2.16.1) des ölhaltigen Überstands eingestellt.

3.1.7 Mikroskopie

Im Zuge der Voruntersuchungen wurden Speichel-, NaCl- (0,9 %) sowie Ölziehproben durch die Methode nach Giemsa gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht.

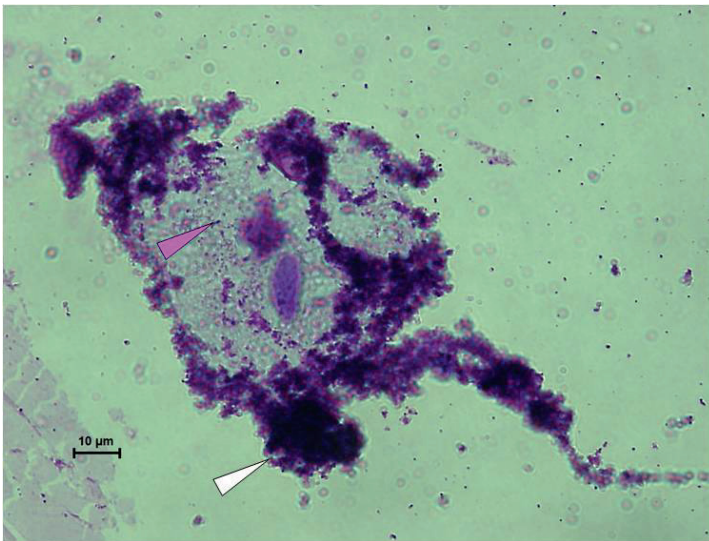


Abbildung 28: Speichel nativ, Giemsa 1:4 (60 × Vergrößerung), Proband B

In diesem reinen Speichelpräparat war die Epithelzellendichte aufgrund der fehlenden Verdünnung höher als in den nachfolgenden Proben. Die Epithelzellen sind überdies von einem dichten Saum aus Proteinen und Bakterien bedeckt (Pfeile: Magenta = Bakterien, Weiß = Proteinkonglomerat).



Abbildung 29: NaCl (0,9 %)-Ziehprobe, Giemsa 1:4 (60 × Vergrößerung), Proband B

In diesem Präparat ist der Proteinanteil deutlich geringer, als in dem konzentrierten Speichelpräparat. Die bakterielle Besiedelung der Epithelzellen durch Kokken, Streptokokken, Diplokokken und Stäbchen wird vom NaCl-Ziehen anscheinend nur wenig beeinflusst (Pfeile: Magenta = Bakterien, Weiß = Proteinkonglomerat).



Abbildung 30: Ölziehprobe, Giemsa, 1:4 (60 × Vergrößerung), Proband B

In diesem Präparat imponiert nicht nur die bakterielle Besiedelung der Epithelzellen, sondern vor allem die deutliche Adhärenz der Ölmizellen an der Epithelzellmembran und an den Bakterien. Es scheint eine physikalisch/chemische Assoziation von Öl zu Zellen und Bakterien zu geben (Pfeile: Magenta = Bakterien, Weiß = Proteinkonglomerat, Gelb = Ölmizellen).

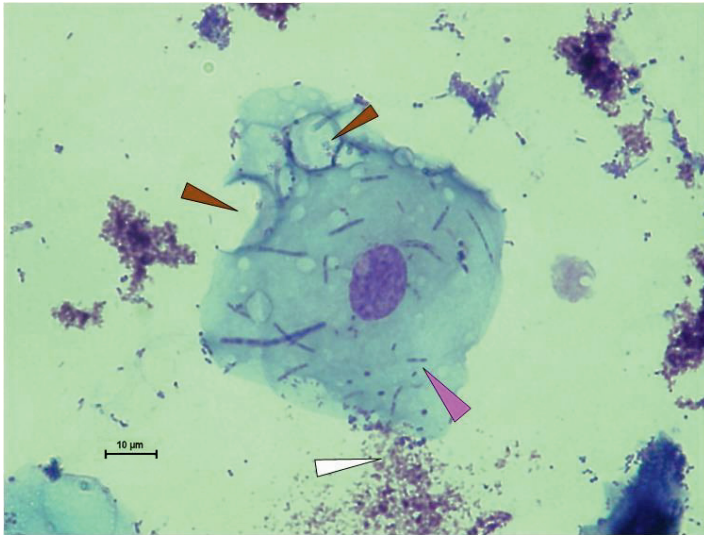


Abbildung 31: Ölziehprobe, Methanol fixiert, Giemsa 1:4 (60 × Vergrößerung), Proband B

Zum Verifizieren dieser Assoziation von Öl zur Epithelzellmembran wurde das Öl vollständig mittels Methanol aus der Probe entfernt. Das Präparat zeigt deutliche Residualvakuolen der ehemals vorhandenen Anlagerungsstellen (Pfeile: Magenta = Bakterien, Weiß = Proteinkonglomerat, Braun = Residualvakuolen).

3.2 Ergebnisse, Kultivierung (Hauptversuch)

Insgesamt wurden für die Kultivierung und Sequenzierung 81 Proben untersucht, wovon 15 Negativ- und Positivkontrollen in je dreifacher Ausführung waren.

3.2.1 CFU/Gesamtvolumen: Mittelwert aus 3 Tagen, Vergleich vorher/nachher mit NaCl (0,9 %) und Öl

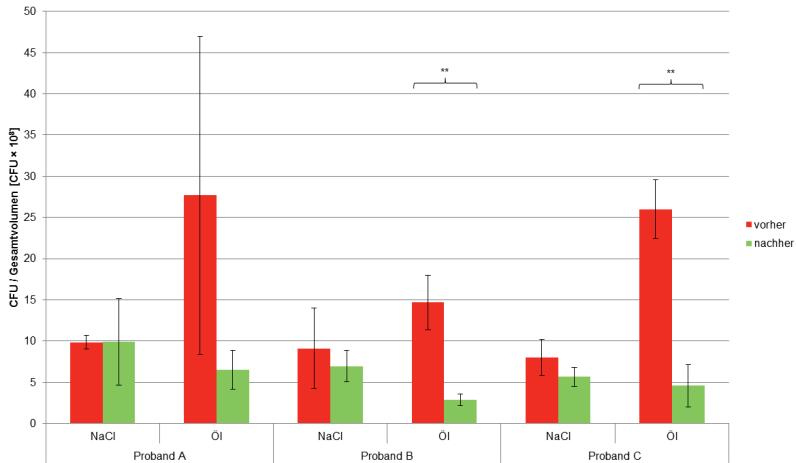


Abbildung 32: CFU/Gesamtvolumen, Mittelwert aus 3 Tagen (COLS)

Die Standardabweichungen fallen lokal hoch aus, was an der geringen Anzahl an Messpunkten sowie an der allgemeinen Fehlerquelle kultivierbarer Spezies liegt. Im Allgemeinen lässt sich eine eindeutige Tendenz zur gesteigerten Reduktion von Bakterien durch Öl erkennen. Jedoch liegt die Anzahl kultivierbarer Bakterien zu Beginn des Ölziehens stets auf einem höheren Niveau als beim NaCl-Ziehen. (Tab. 13) Der Unterschied von CFU/Gesamtvolumen ist zwischen den Vorher-Nachher-Kontrollen des Öl- bzw. NaCl-ziehens von Proband B und C sehr signifikant (Proband A: Signifikanzniveau 5 %, $p = 0,37$ %, Proband B: Signifikanzniveau 5 %, $p = 0,01$ %).

3.2.2 CFU/ml Probe: Vergleich vorher/nacher mit NaCl (0,9 %) und Öl

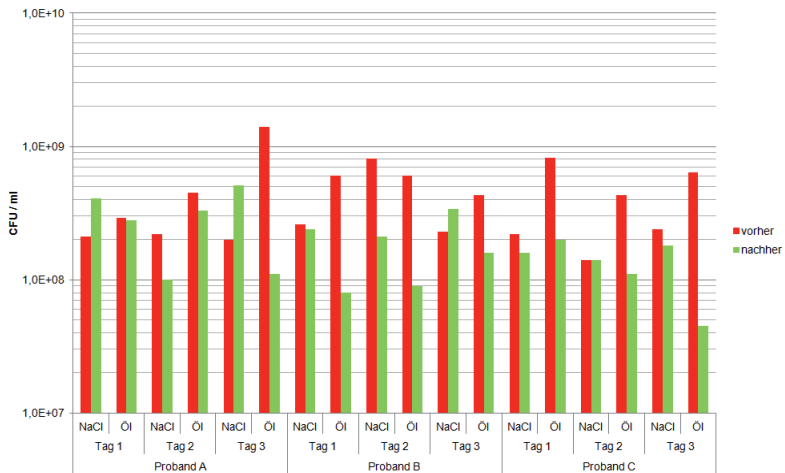


Abbildung 33: Halblogarithmische Darstellung der CFU/ml. Proben aufgeschlüsselt nach Versuchstagen (COLS)

Im Tagesvergleich ist bei allen Probanden eine klare Reduktion beim Ölziehen zu erkennen: Bei Proband A ansteigend nach Tagen und bei den Proband B im Mittel eine Reduktion um einen Quotienten von 5,6 und bei Proband C um einen Quotienten von 7,4. Die Werte für das NaCl-Ziehen zeigen keinen eindeutigen Trend und liegen sogar des Öfteren nach dem NaCl-Ziehen höher als zuvor, was beim Ölziehen nicht der Fall ist. (Tab. 13)

3.2.3 Darstellung der CFU-Reduktion in Prozent, bezogen auf die Vorherwerte (100 %)

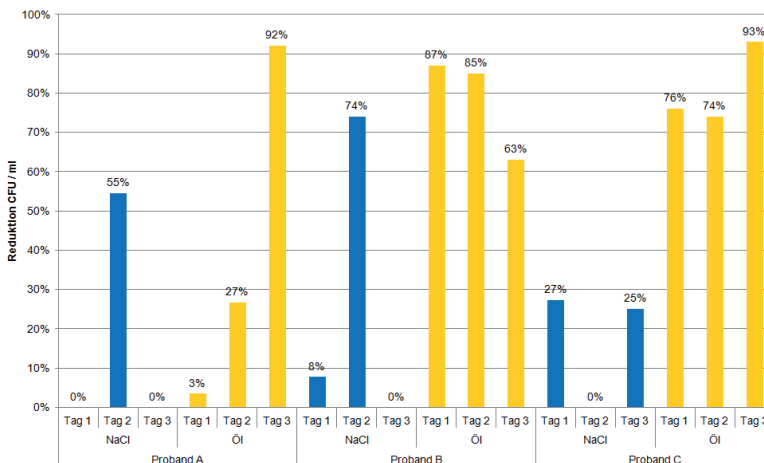


Abbildung 34: Reduktion durch NaCl-/Ölziehen in Prozent

Die Darstellung in Prozent verdeutlicht das Bild von Abbildung 32. Während NaCl (0,9 %) in vier Proben keinerlei Reduktion erbracht hat, lässt sich im Allgemeinen sagen, dass Sonnenblumenöl bei der CFU-Reduktion deutlich im Vorteil gegenüber NaCl (0,9 %) ist. Dies ist jedoch relativ, da die großen Schwankungen zu bedenken sind.

Die Reduktion von Proband C ist im Mittel der Proben als einzige sehr signifikant (Signifikanzniveau 5 %, $p = 0,18$ %). Die Reduktion für Proband C entspricht $81,00 \pm 8,52$ % und die Reduktion für Proband B liegt bei $78,33 \pm 10,87$ %. Die Werte entsprechen je 1– (Nachher- dividiert durch den Ausgangs-CFU-Wert). (Tab. 13)

3.2.4 Absoluter CFU-Wert aus den Gemischen NaCl-Speichel und Öl-Speichel

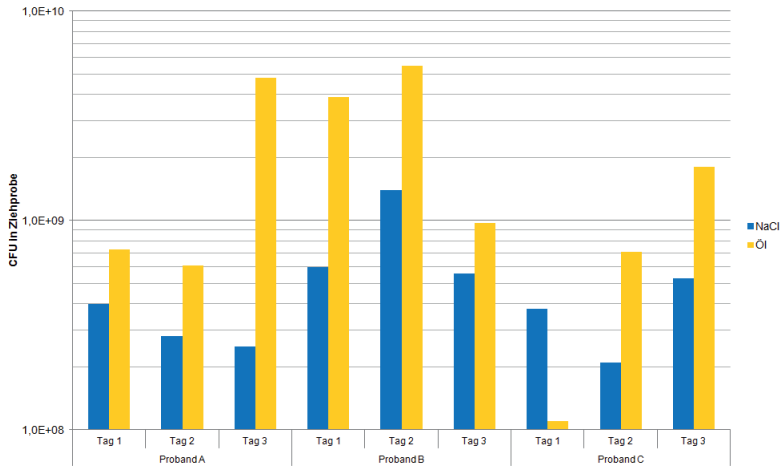


Abbildung 35: CFU in Ziehproben, hochgerechnet auf die Gesamtprobenvolumina, halblogarithmische Darstellung

In dieser Abbildung sind im Gegensatz zu den vorangegangenen Abbildungen nicht Vorher-Nachher-Vergleiche betrachtet worden, sondern die theoretischen Gesamt-CFUs (hochgerechnet auf das Gesamtvolumen) aus den Ziehproben. Zu erkennen ist, dass in den Ölziehproben deutlich mehr Bakterien zu finden sind. (Ausnahme: Proband C Tag 1, Tab. 13)

3.2.5 Absoluter CFU-Wert aus den Gemischen NaCl-Speichel und Öl-Speichel pro ml Speichel

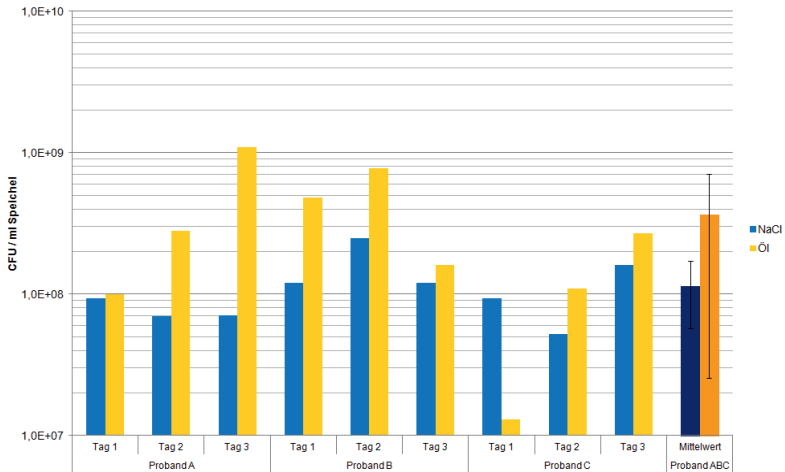


Abbildung 36: CFU/ml Speichel hochgerechnet auf das reine Speichelvolumen, halblogarithmische Darstellung

Da sich in reinem NaCl (0,9 %) und Sonnenblumenöl keine oralen Bakterien befinden, wurde bei dieser Abbildung das Ziehmedium herausgerechnet und nur das vorhandene Speichelvolumen in der Probe betrachtet. Das Diagramm verdeutlicht, wie in Abbildung 32, die Überlegenheit des Ölziehens, jedoch zeigt sich im Mittelwert der zusammengefassten Probanden eine große Standardabweichung. Bei Proband A nimmt die CFU innerhalb der drei Ziehtage mit Öl stetig zu. (Tab. 13)

3.2.6 Speichelvolumen in Ziehproben: Vergleich der Probanden an drei Tagen mit NaCl (0,9 %) und Öl

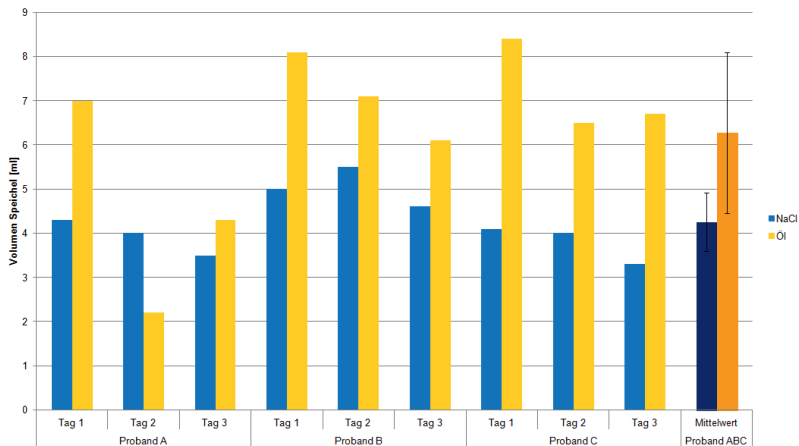


Abbildung 37: Speichelvolumen in den Ziehproben

In dieser Abbildung ist eindeutig zu erkennen, dass beim Ölziehen deutlich mehr Speichelproduktion erfolgt ist, als beim NaCl-Ziehen. (Ausnahme Proband A, Tag 2)
Das Sonnenblumenöl scheint eine erhöhte Speichelbildung zu induzieren. (Tab. 13)

3.3 Sequenzierergebnisse

3.3.1 Darstellung der Problematik von verschiedenen Regionen der 16S rDNA und Datenbanken

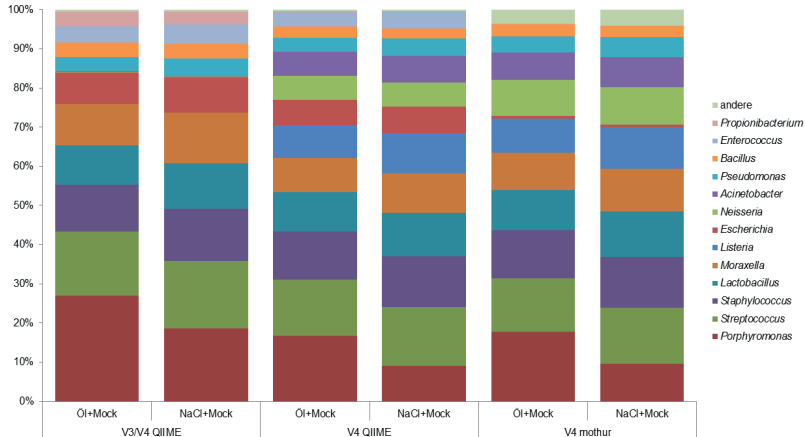


Abbildung 38: Vergleich der Datenbanken über die Mock-Community

Die Mock-Community dient der Qualitätssicherung und Kontrolle der DNA-Extraktion, PCR, Sequenzierung sowie der Bioinformatik. Sie enthält eine standardisierte Menge (OD_{600}) von verschiedenen Bakterien mit unterschiedlichen Morphologien und Zellwandeigenschaften (Tab. 3). Es soll sichergestellt werden, dass alle vorhandenen Bakterien identifiziert werden können. Dies ist die Grundlage für die gesamte funktionsfähige Extraktions- und Detektionsmethode.

Mit der verwendeten Methodik ist es möglich, sämtliche vorhandene Bakterien in einem Öl- oder NaCl-Gemisch zu extrahieren und zu identifizieren. Dies ist jedoch nur auf der Ebene der Gattungen zuverlässig erreichbar. Durch die hohe Anzahl von Replikationszyklen bei der Amplikon-I und -II PCR sowie der Sequenzierung entstehen Replikationsfehler, die zu Detektionsungenauigkeiten auf dem Level der Spezies und Subspezies führen. Sowohl in den Sonnenblumenöl-, als auch in den NaCl-Kontrollen wurden alle Gattungen in ähnlichem Verhältnis gefunden. Somit sind Öl und NaCl (0,9 %) in der Lage das gesamte Keimspektrum aufzunehmen. Mit den insgesamt 81 Proben wurden zwei Sequenzierläufe durchgeführt. Sowohl mit der längeren V3–V4-Region (549 bp), als auch mit der kürzeren V4-Region (299 bp) wurden die Ergebnisse mit zwei unterschiedlichen Datenbanken (mothur/QIIME™) verglichen. Dabei existiert keine Datenbank von mothur für die V3–V4-Region. Die Abbildung 38 macht deutlich, dass die Sequenzierergebnisse von der

Betrachtungsweise durch die verschiedenen Datenbanken und die unterschiedlichen Regionen der 16S rDNA (V1–V9) abhängen. Es ist zu erkennen, dass bei der Untersuchung der Ergebnisse mit der V4-Region und der QIIME™-Datenbank die homogensten Ergebnisse zu erzielen waren. Dies ist die Grundlage für alle weiteren Betrachtungen, die auf der V4-Region und der QIIME™ Datenbank basieren. Im Folgenden wurden nur diese Daten verwendet, da große Datenmengen generiert wurden und diese unter Berücksichtigung der bestmöglichen Qualität untersucht werden sollten, denn nur bei der V4-Region mit QIIME™ tauchen alle 13 Bakterien der Positivkontrolle auf. Bei der V4-Region mit *mothur* resultieren 12 Bakterien, jedoch 3,9 % an nicht oder falsch identifizierten Gattungen. Mit der V3–V4-Region (QIIME™) konnten lediglich 10 Bakterien der Positivkontrolle gefunden werden.

3.3.2 Bakterielle Zusammensetzung von NaCl (0,9 %) und Öl mit der Mock-Community

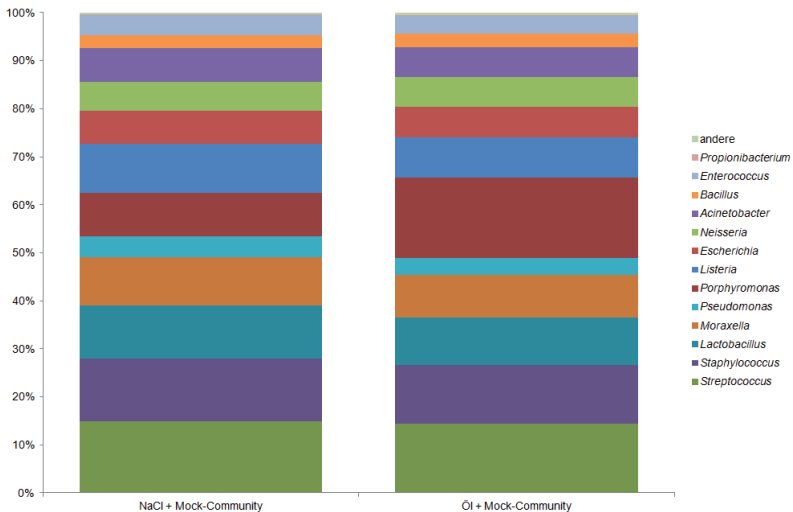


Abbildung 39: Vergleich von NaCl (0,9 %) und Öl über die Mock-Community (V4, QIIME™) nach Gattung

Sowohl NaCl (0,9%) als auch Sonnenblumenöl sind eindeutig in der Lage, das gesamte Keimspektrum der Positivkontrolle aufzunehmen. Die Verteilung ist vergleichbar und homogen. Einen deutlichen Unterschied gibt es lediglich bei *Porphyromonas*, welches das Öl (16,8 %) besser aufzunehmen scheint als NaCl (9,1 %). Die Differenz beträgt 7,7 %.

3.3.3 Bakterielle DNA aus den Negativkontrollen, n = 3 je Säule

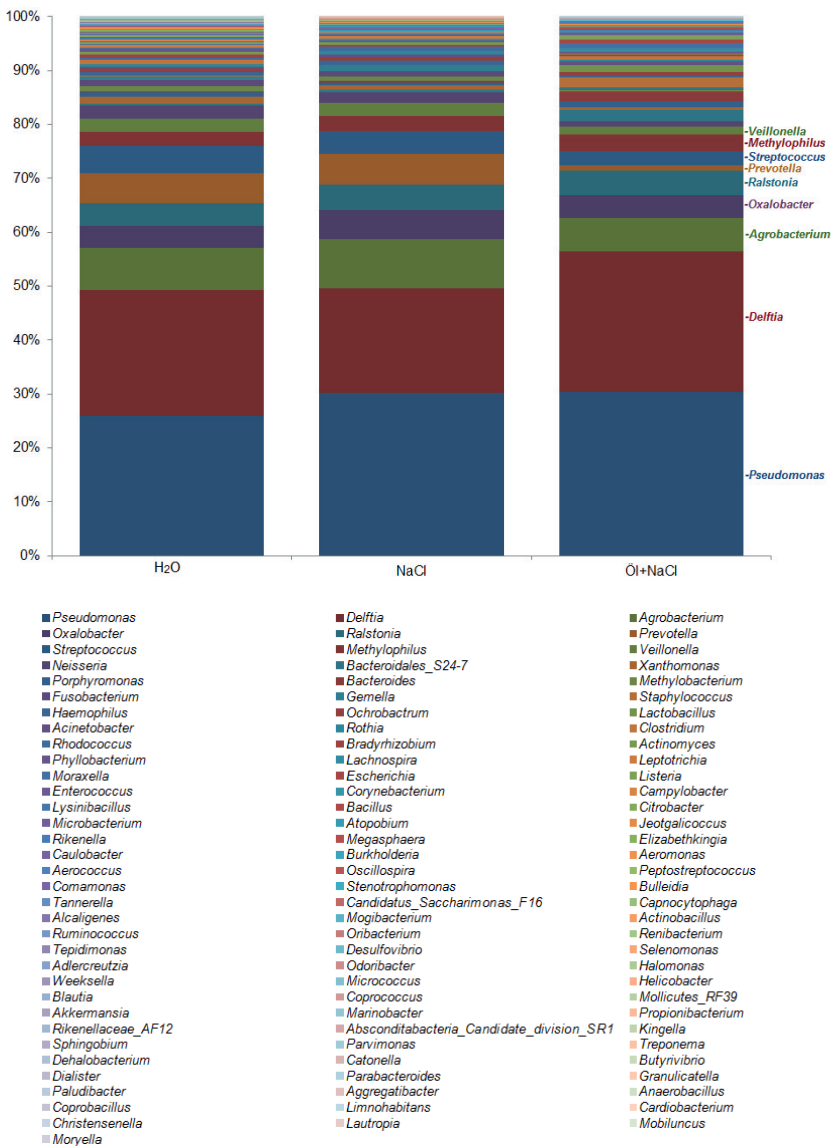


Abbildung 40: Negativkontrollen, Vergleich der Medien (V4, QIIME™)

Der Inhalt der Negativkontrollen wird zu ca. 80 % durch neun bakterielle Gattungen in absteigender Reihenfolge bestimmt. (*Pseudomonas* > *Delftia* > *Agrobacterium* > *Oxalobacter* > *Ralstonia* > *Prevotella* > *Streptococcus* > *Methylophilus* > *Veillonella*). Unterschiede existieren in den oberen 20 %, die eine große Varianz bei einer sehr geringen Anzahl an Readcounts zeigen.

3.3.4 Anzahl der Reads aus den Negativkontrollen, summiert aus je drei Proben, Vergleich der Medien je Analyse

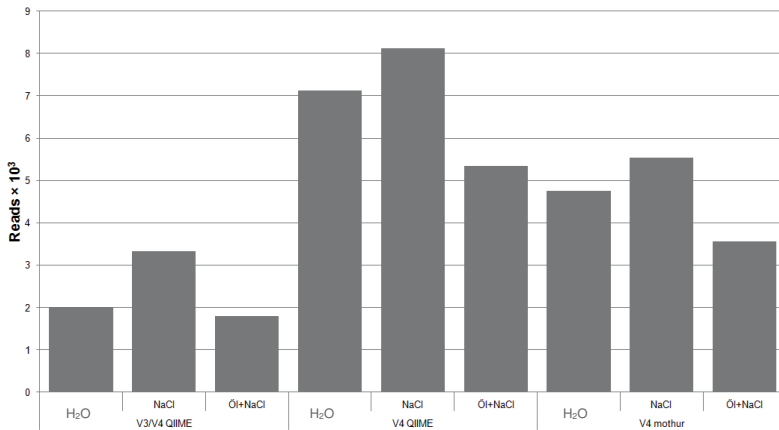


Abbildung 41: Vergleich der generierten Reads aus den Negativkontrollen mit verschiedenen Datenbanken und Regionen

Diese Abbildung verdeutlicht, dass bei der V3–V4-Region stets geringere Readcounts generiert wurden. Der Verlauf der Säulendiagramme ist bei allen Regionen und Datenbanken identisch. Bei der physiologischen Kochsalzlösung wurde die größte Menge bakterieller DNA gefunden und bei dem Öl-NaCl-Gemisch die geringste. Zu beachten ist, dass jeder detektierte Read, der gelesen wurde, in allen Diagrammen berücksichtigt und kritisch dargestellt ist.

3.3.5 Individuelle Mikrobiome der Probanden nach Gattungen

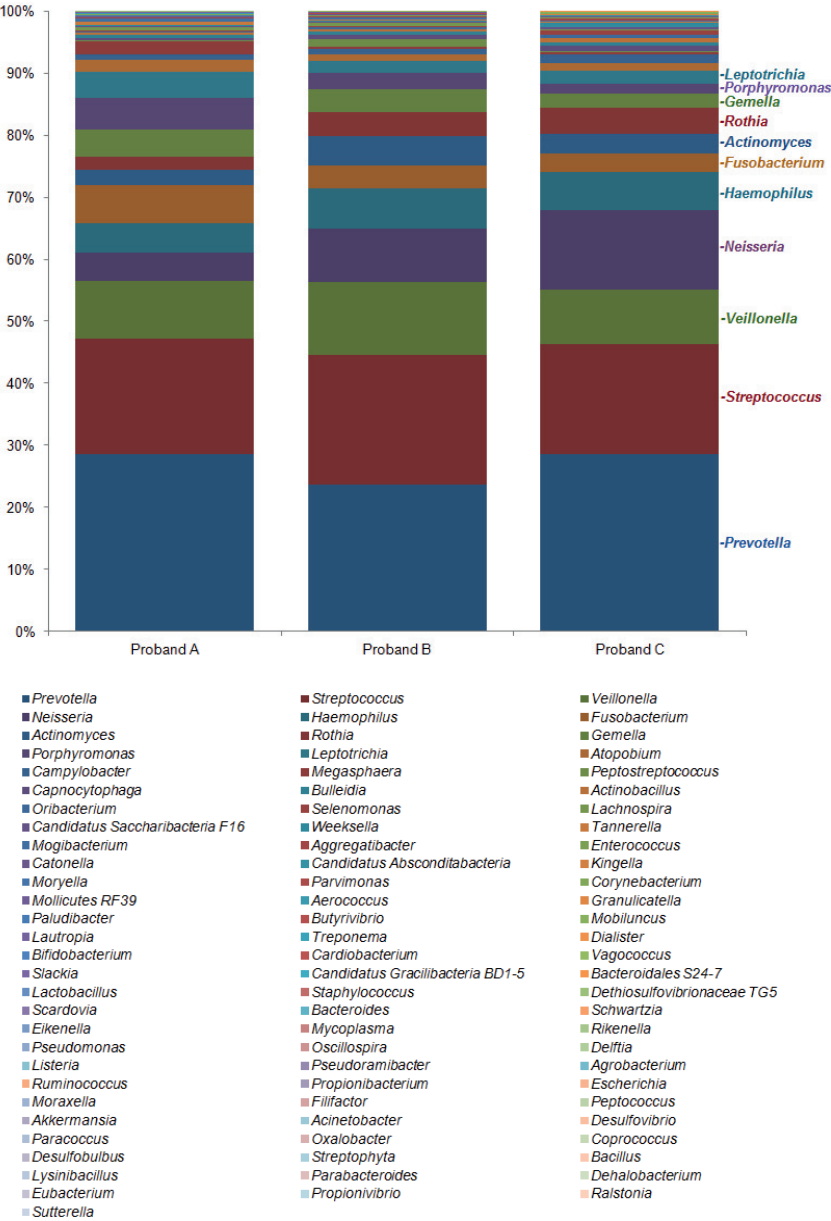


Abbildung 42: Gesamtheit der oralen Probandenmikrobiome, n = 3 je Speichelprobe (V4, QIIME™)

Die individuellen Probandenmikrobiome liegen prozentual nahe zusammen. Über 50 % aller Bakterien werden alleine durch drei Gattungen bestimmt: *Prevotella*, *Streptococcus* und *Veillonella*. Über 90 % aller Bakterien des oralen Mikrobioms werden lediglich durch 11 Bakterien in absteigender Reihenfolge charakterisiert: *Prevotella* > *Streptococcus* > *Veillonella* > *Neisseria* > *Haemophilus* > *Fusobacterium* > *Actinomyces* > *Rothia* > *Gemella* > *Porphyromonas* > *Leptotrichia*. Insgesamt wurden 85 verschiedene Genera gefunden, wobei sich die Probanden untereinander lediglich 60 Genera miteinander teilen. Bei Proband A wurden insgesamt 75, bei Proband B 70 und bei Proband C 71 Genera gefunden.

3.3.6 Individuelle Mikrobiome der Probanden nach (bakterieller) Sauerstofftoleranz

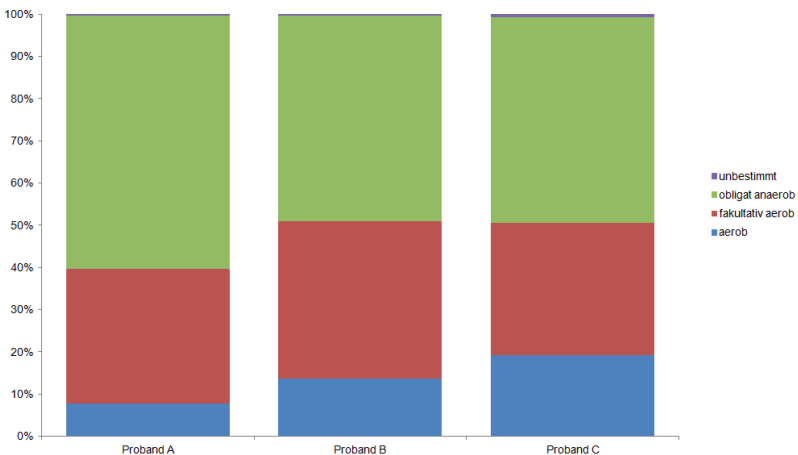


Abbildung 43: Sauerstofftoleranz der Probandenmikrobiome (V4, QIIME™)

Die Probanden teilen nach der Sauerstofftoleranz der gefundenen Bakterien ein ähnliches Keimspektrum. Abweichungen gibt es bei Proband A, welcher 11 % mehr obligat anaerobe und deutlich weniger aerobe Bakterien als die Probanden B und C beherbergt. Im Mittel liegt der Anteil von aeroben (inklusive fakultative Aerobier) und obligat anaeroben Gattungen bei 47:52 %. Der prozentuale Anteil unbestimmter Bakterien liegt im Mittel bei 0,5 %. Betrachtet wurden hierfür die Ruhespeichelproben von den Tagen 1, 12 und 16 (siehe Abb. 2), da diese Proben den größtmöglich zeitlichen Abstand zum Öl-/NaCl-Ziehen besitzen und das individuelle orale Mikrobiom der Probanden widerspiegeln.

3.3.7 Individuelle Mikrobiome der Probanden nach Gramverhalten

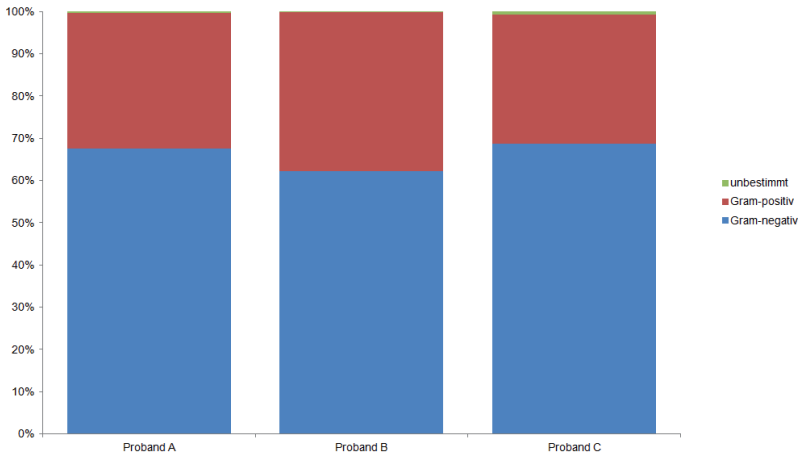


Abbildung 44: Gramverhalten der Probandenmikrobiome (V4, QIIME™)

Alle Probanden zeigen im Mittel ein Verhältnis von 66:33 % von gramnegativen zu grampositiven Gattungen. Proband B hat einen 6 % höheren Anteil an grampositiven Bakterien. Der Anteil an unbestimmten Bakterien hat einen Mittelwert von nur 0,4 %. Betrachtet wurden hierfür die Ruhespeichelproben von den Tagen 1, 12 und 16 (siehe Abb. 2), da diese Proben den größtmöglichen zeitlichen Abstand zum Öl-/NaCl-Ziehen besitzen und das individuelle orale Mikrobiom der Probanden widerspiegeln.

3.3.8 Bakterielle Zusammensetzung der Medien: Speichel, NaCl (0,9 %),
Öl summiert aus je drei Proben, Vergleich der Probanden

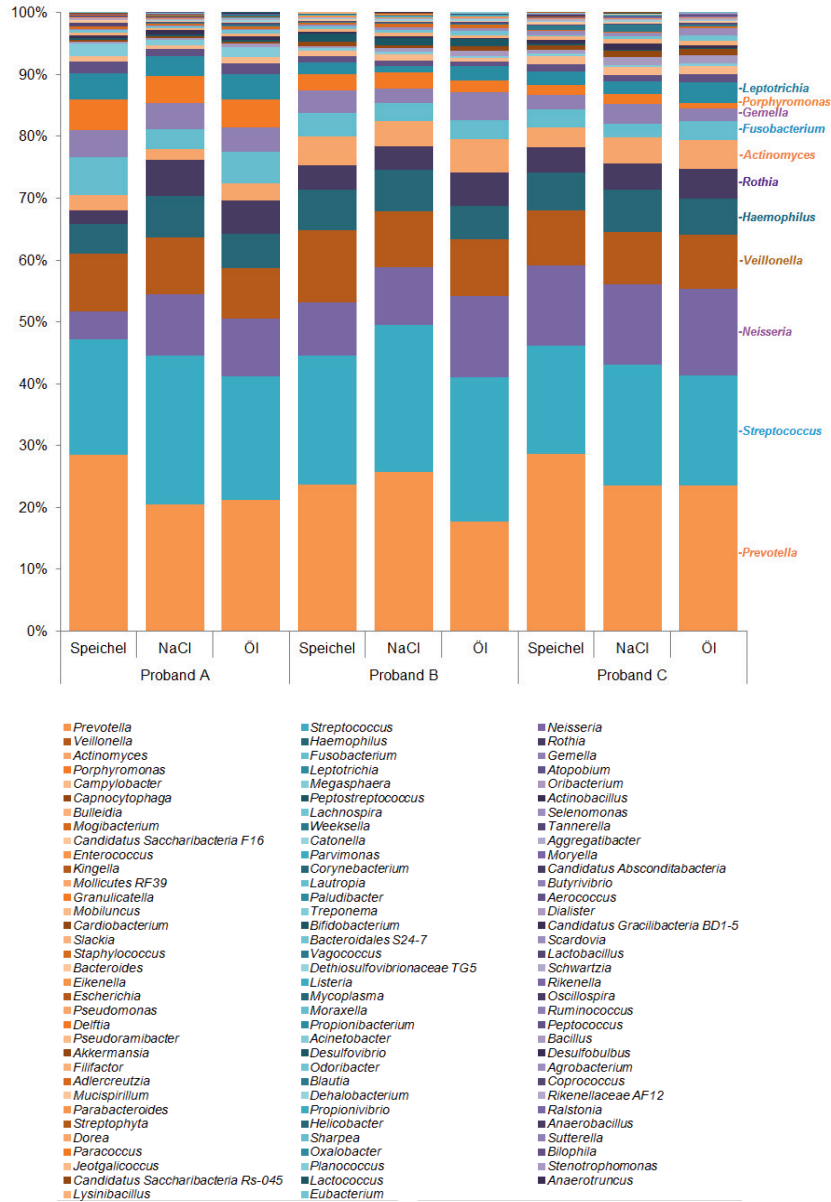


Abbildung 45: Vergleich der Medien je Proband nach Gattung (V4, QIIME™)

Die Anzahl und Verteilung der gefundenen bakteriellen Gattungen liegen sowohl bei den verschiedenen Probanden als auch bei den Ziehmedien (NaCl/Öl) und den Speichelskontrollen auf einem ähnlichen Niveau, jedoch sind durchaus auch physiologische Fluktuationen vorhanden. Jede Säule entspricht dem Mittelwert aus drei Proben. Es ist damit zu rechnen, dass bei einer höheren Anzahl von Proben noch homogenere Ergebnisse zu erwarten sind. Es ist kein eindeutiger Trend oder Unterschied der Probanden zu erkennen.

3.3.9 Sauerstofftoleranz der bakteriellen Zusammensetzung der Medien: Speichel, NaCl (0,9 %) und Öl, summiert aus je drei Proben, Vergleich der Medien je Proband

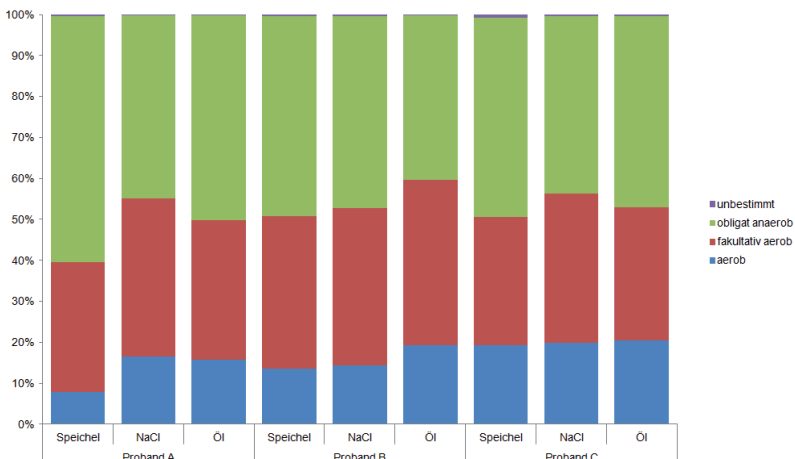


Abbildung 46: Vergleich der Medien je Proband nach Atmungsverhalten (V4, QIIME™)

Schlüsselt man die extrahierten Bakterien nach ihrer Sauerstofftoleranz auf, sind nur geringe Unterschiede festzustellen. Lediglich bei Proband A wurden im Ruhespeichel 11,2 % mehr obligate Anaerobier identifiziert als im Mittel bei den Probanden B und C.

Der Mittelwert in reinem Speichel aller Probanden liegt bei 13,5 % Aerobier, 33,5 % fakultative Aerobier und 52,5 % obligate Anaerobier.

Der Mittelwert für das NaCl-Ziehen aller Probanden liegt bei 16,9 % Aerobier, 37,8 % fakultative Aerobier und 45 % obligate Anaerobier.

Der Mittelwert für das Ölziehen aller Probanden liegt bei 18,5 % Aerobier, 35,7 % fakultative Aerobier und 45,6 % für obligate Anaerobier.

3.3.10 Gramverhalten der bakteriellen Zusammensetzung der Medien: Speichel, NaCl (0,9 %) und Öl, summiert aus drei Proben, Vergleich der Medien je Proband

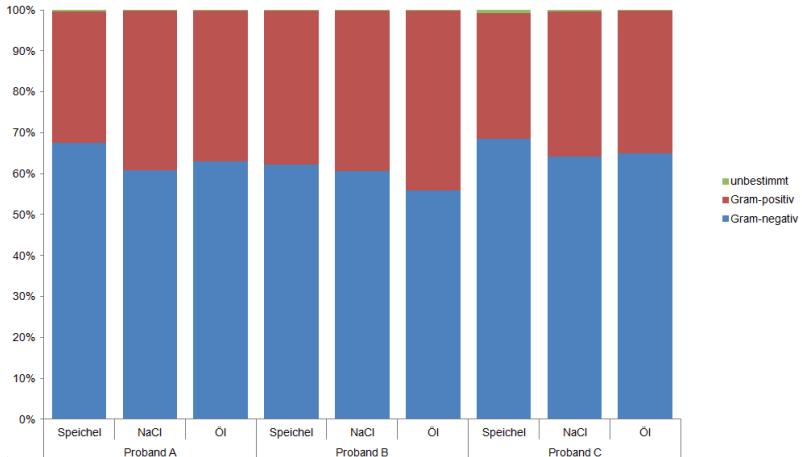


Abbildung 47: Vergleich der Medien je Proband nach Gramverhalten (V4, QIIME™)

Noch homogener sind die betrachteten Unterschiede im Bezug auf das Gramverhalten. Es existiert kein signifikanter Unterschied zwischen den Probanden, Ziehmedien und den Speichelkontrollen. Im Mittel beträgt das Verhältnis 63:37 % von gramnegativen zu grampositiven Bakterien.

Der Mittelwert in reinem Speichel aller Probanden liegt bei 66,2 % gramnegativer zu 33,5 % grampositiver Keime.

Der Mittelwert für das NaCl-Ziehen aller Probanden liegt bei 61,9 % gramnegative zu 37,9 % grampositiver Keime.

Der Mittelwert für das Ölziehen aller Probanden liegt bei 61,2 % gramnegative zu 38,5 % grampositiver Keime.

3.3.11 Visualisierung der Unterschiede der oralen Mikrobiome

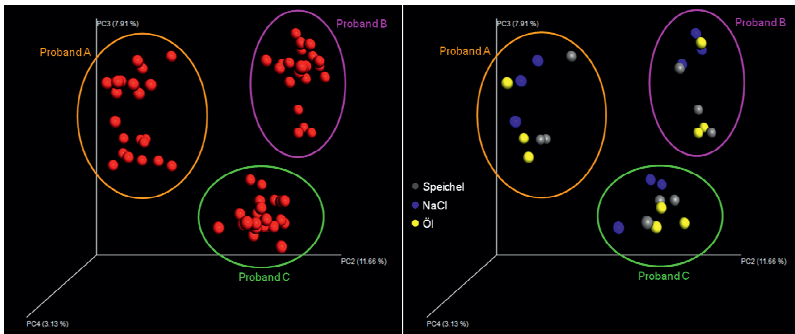


Abbildung 48: Dreidimensionale Darstellung der Probandenmikrobiome inklusive Ziehproben (V4, QIIME™), PCA

Diese Abbildung verdeutlicht, dass es trotz der beschriebenen Ähnlichkeit der Probandenmikrobiome in über 90 % der bakteriellen Gattungen und ihrer Anzahl auch wesentliche Unterschiede gibt. Jeder Punkt bildet die Gesamtheit aller erzielten Reads einer Probe im dreidimensionalen Raum (Principle-Coordinates-Analysis, PCA) ab. Diese Betrachtung stützt die Annahme, dass sowohl NaCl (0,9 %) als auch Sonnenblumenöl das komplette orale Mikrobiom aufnehmen und repräsentativ widerspiegeln können. Jede Probe lässt sich zweifelsfrei einem Probanden zuordnen. Es existiert für jeden Probanden ein eigener charakteristischer Fingerabdruck des oralen Mikrobioms (Punktwolke). Jede Sphäre (Abb. 48) entspricht dabei dem Gesamtmikrobiom einer einzelnen Probe insgesamt 22 pro Proband (links), 9 pro Proband (rechts).

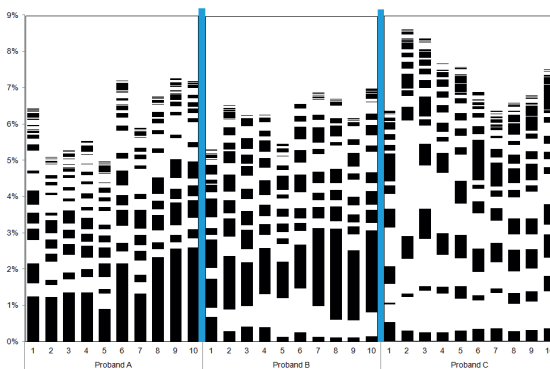


Abbildung 49: Darstellung des oralen Mikrobioms mittels Barcode, Proband A, B, C (Speichel)

Zur Veranschaulichung der Differenzen der Sequenzierergebnisse wurden Barcodes von den oberen 9 % der gefundenen Bakterien erstellt. Als Referenz wurde willkürlich Proband A gewählt. Die Höhe der Säulen, unterteilt nach Weiß und Schwarz, beschreibt die Anzahl an gefundenen Reads und die Achse von 0 bis 9 % klassifiziert den Genus. Als Proben wurden je Proband 10 Speichelkontrollen ohne jeden Einfluss von Öl oder NaCl (0,9 %) über 24 h gewählt. Das Zeitintervall zwischen Probe 1 und 10 liegt bei 16 Tagen (Abbildung 2). Das Diagramm soll einen individuellen Fingerabdruck (Barcode) und die damit verbundene Singularität der oralen Mikrobiome, die vor allem in den Bakterien mit geringem Anteil am Gesamtmikrobiom liegen, illustrieren.

3.3.12 Vergleich: CFU und Reads pro Speichelvolumen im zeitlichen Verlauf

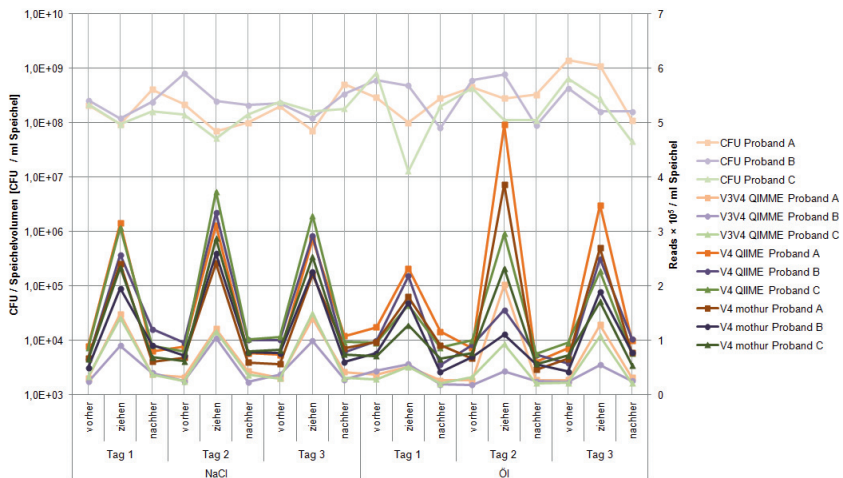


Abbildung 50: Vergleich von CFU und Reads im zeitlichen Verlauf

Diese Abbildung verdeutlicht, dass ungeachtet der verwendeten Datenbank die Anzahl der Reads in den Ziehproben verglichen mit den Vorher- und Nachherkontrollen am höchsten ist (Tab. 14). Die Readanzahl ist bei allen Probanden nach dem Ziehen auf einem ähnlichen Niveau wie vorher. Jedoch lässt die Anzahl an detektierten Reads keinen Rückschluss auf die Ursprungskonzentration zu, da alle Proben zuvor auf gleiche Konzentrationen (PCR und Sequenzierung) verdünnt werden mussten. Der Vergleich mit den errechneten CFU der Schafblutagarergebnisse zeigt keine Vergleichbarkeit und große Schwankungen. Die höheren Peaks bei den Ziehproben resultieren aus der Berechnung auf das Speichelvolumen. Da bei den Ziehproben mehr Speichel produziert (Abb. 37) und über einen längeren Zeitraum (15 min statt

5 min) gesammelt wurde, entstehen auf das Speichelvolumen hin betrachtet höhere theoretische Readcounts.

3.3.13 Reads erzielt aus den Ziehproben: Mittelwert aus je drei Tagen, Vergleich der Probanden mit NaCl (0,9 %) und Öl

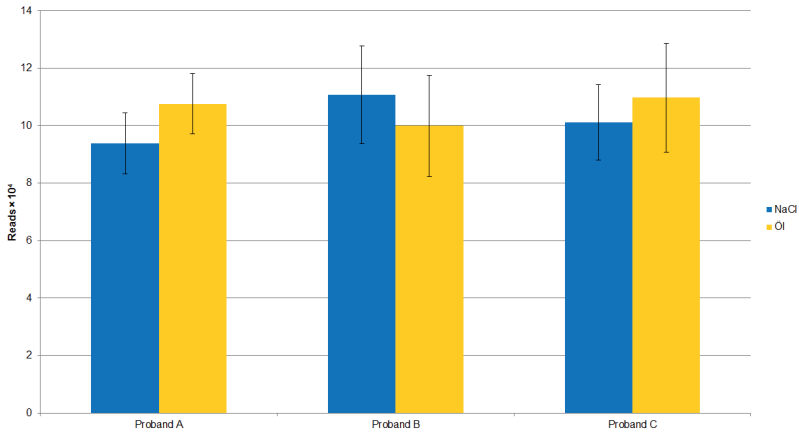


Abbildung 51: Readcounts in Medien, Vergleich NaCl (0,9 %) und Öl, Mittelwert aus drei Proben (V4, QIIME™)

Die gesamte Anzahl aller Reads in den Ziehproben zeigt, dass aus NaCl (0,9 %) und Sonnenblumenöl ähnlich hohe Lesezahlen erzielt werden konnten. Im Mittel liegt die Anzahl der Reads bei 10×10^4 (Tab. 14).

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Vergleich der Methoden anderer Autoren

Dies sind die bisher ersten Untersuchungen des Ölziehens auf Grundlage moderner, taxonomischer Sequenzieretechnik der 16S rDNA. Auch die Etablierung der bakteriellen DNA-Extraktion aus Ölziehproben mittels einer Kombination aus enzymatischer und mechanischer Lyse wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben und in dieser Arbeit aufwendig erstmals entwickelt. Die bereits vorhandenen Studien zur Effektivität des Ölziehens basieren zum Großteil lediglich auf der Grundlage klinischer Entzündungsparameter (Plaque- und Gingivalindizes) sowie auf der Kultivierung ausgewählter Bakteriengattungen, insbesondere *S. mutans* (Anand T.D. *et al.* 2008). Auch wird in diesen Studien Chlorhexidin als Negativkontrolle verwendet. Hierauf wurde in dieser Arbeit bewusst verzichtet, denn im Vergleich zu Chlorhexidin wirkt Sonnenblumenöl nicht antimikrobiell (Abb. 14). Daraus ergibt sich, dass die eventuelle Reduktion des oralen Mikrobioms nicht auf desinfizierenden Eigenschaften des verwendeten Mediums beruht, sondern vielmehr auf der Aufnahme von Bakterien in das Öl. Ein wichtiger Parameter zur Unterscheidung der bisher beschriebenen Studien ist die Anzahl der Aktionstage. Diese reichen von 10 Tagen (Asokan *et al.* 2009) bis zu 45 Tagen (Saravanan D *et al.* 2013). In dieser Arbeit sollte eine Pilotstudie durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden drei Aktionstage festgelegt. Dabei ist zu beachten, dass Autoren wie (Peedikayil *et al.* 2015) erst nach einer Woche überhaupt einen Effekt des Ölziehens erkannten, Grießl, Domann *et al.* in dieser Arbeit jedoch schon ab dem ersten Tag eine bakterielle Reduktion durch das Ölziehen im Vergleich zu dem NaCl (0,9 %) zeigen konnten (Abb. 32). Diese Dissertation und die dazugehörige Veröffentlichung betrachtet deshalb die Nullhypothese des Ölziehens im Vergleich zum NaCl-Ziehen. Die Ölziehdauer von 15 min morgens, auf leeren Magen und vor oralen Hygienemaßnahmen deckt sich weitgehend mit der Methodik der vorhandenen Studienlage. Grundlegende Hypothesen, weshalb das Ölziehen täglich nur einmal praktiziert werden sollte und inwieweit mehrmaliges Ölziehen unterschiedliche Effekte verursachen könnte, sind in der Literatur nicht beschrieben. Auch wurden bis *dato* lediglich Studien durchgeführt, die junge und mit Ausnahme einer Gingivitis oder Halitosis gesunde Probanden einbezogen. Klinisch höchst relevante Krankheitsparameter wie z. B. eine manifeste Parodontitis oder Xerostomie und die hierbei potentiell großen Einflüsse des Ölziehens, wurden bisher noch nicht erwähnt.

4.1.2 Vergleich verschiedener Öle

Zunächst lässt sich feststellen, dass das in dieser Dissertation verwendete Sonnenblumenöl (*Oleum Helianthi raffinatum*) *per se* keine antibakteriellen Eigenschaften besitzt (Abb. 14). In der Literatur werden als Ziehmedium viele verschiedene Öle untersucht, wie z. B. Zitronengrasöl (Dany *et al.* 2015), Sesamöl (Asokan *et al.* 2011a) bis hin zu Kokosöl (Kaushik *et al.* 2016). Diese Arbeit verwendet bewusst standardisiertes Sonnenblumenöl in pharmazeutischer Qualität ohne jede Beimischung, da nicht auszuschließen ist, dass Zusätze, wie die von ätherischen Ölen, die Ergebnisse verfälschen. Dies könnte mit eine Erklärung dafür sein, dass die Resultate von Studien zum Ölziehen so eklatant auseinandergehen. Kokosöl enthält einen erheblichen Anteil (43–53 %) an Laurinsäure (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft), von welcher aus der Dermatologie gute antimikrobielle Eigenschaften bekannt sind (Nakatsuji *et al.* 2009). Auch wird Reisöl wegen seines besonders antioxidativen Potentials als Alternative zum Sesamöl als Ziehmedium beschrieben (Sheikh und Iyer 2016). Schlussfolgernd hat nicht nur die Methode des Ölziehens, sondern auch die Eigenschaften des verwendeten Ziehmediums erheblichen Einfluss auf die erzielten Effekte.

4.1.3 Vergleich verschiedener Ölziehvolumina

Die in der Literatur beschriebenen Studien zum Ölziehen verwenden unterdessen erheblich unterschiedliche Ziehvolumina. Diese reichen von 2 ml (Singla *et al.* 2014), 10 ml (Kaushik *et al.* 2016), über einen Esslöffel (Asokan *et al.* 2008; Saravanan D *et al.* 2013; Shanbhag 2017) bis hin zu 15 ml (Sood *et al.* 2014). Darüber hinaus gibt es zahlreiche Autoren, die keine standardisiertes Volumen für ihre Untersuchungen festgelegt haben, z. B. (Peedikayil *et al.* 2015) oder (Sheikh und Iyer 2016).

4.1.4 Diskussion der technischen und bioinformatischen Methodik

Es wurde in dieser Arbeit die Technologie der 16S rDNA-Sequenzierung kritisch unter verschiedenen bioinformatischen Gesichtspunkten untersucht.

4.1.4.1 Vergleich verschiedener Regionen der 16S rDNA V4/V3–V4

Der Aufbau und die Qualität der Reads wird im Wesentlichen durch die gewählte Region der 16S rDNA und die Größe des Überlappungsbereichs (Overlap) von Originalstrang und Kopie beeinflusst. Die V4-Region hat eine Größe von 290 bp und einen Overlap von 210 bp. Dies bedeutet, dass das DNA-Fragment mit 290 bp sehr kurz, der Overlap zwischen DNA-Strang und Kopie mit 210 bp jedoch verhältnismäßig groß ist. Die Identifizierung eines Bakteriums durch die statistisch niedrigere Fehlerlesewahrscheinlichkeit hat somit eine höhere Spezifität als bei der V3–V4-

Region. Nachteilig ist, dass bei diesem kurzen DNA-Abschnitt durch die nicht immer zuverlässig arbeitende Polymerase Stränge synthetisiert werden, die nie in der Originalprobe vorhanden waren, da der Sequenzierlauf 251 Replikationszyklen umfasst. Auch fehlerhafte oder zufällig gebildete DNA-Stränge werden auf diese Weise exponentiell vervielfältigt. Zusammenfassend werden bei der V4-Region zuverlässig jene Bakterien erkannt, die in der Probe vorhanden waren. Die Vermutung, dass irreale zusätzliche DNA-Stränge gebildet und erkannt werden, liegt nicht nur nahe, sondern lässt sich mit der Darstellung in Abb. 41 beweisen. Die Readcounts sind im Mittel bei der V4-Region doppelt so hoch wie bei der V3–V4-Region, und dies aus identischen Proben bzw. Negativkontrollen.

Die größere V3–V4-Region der 16S rDNA hat 440 oder 460 bp und einen Overlap von 20 oder 30 bp. Das bedeutet, dass bei einem langen DNA-Fragment die Wahrscheinlichkeit für zufällig gebildete Produkte, wie bei der kürzeren V4-Region statistisch deutlich geringer ist. Es existieren auch Nachteile des nur kurzen Overlaps von 20 oder 30 bp, denn bei der Sequenzierung besteht hier die Möglichkeit, dass ein Bakterium als nicht existent oder als ein Bakterium anderer Gattung gelesen wird. Die Spezifität ist somit geringer.

Zusammenfassend kann anhand der in dieser Dissertation generierten Daten gesagt werden, dass bei der V4-Region deutlich mehr Bakterien identifiziert werden können, die vermutlich nicht in der Originalprobe vorhanden waren und die Quantität der Sequenzierung damit relativ hoch ist (Abb. 41). Dafür wurden zuverlässig Bakterien erkannt, die in der Probe existierten (Abb. 38). Die Qualität ist somit besser als bei der V3–V4-Region mit dem nur sehr kurzen Overlap.

4.1.4.2 Vergleich der Datenbanken mothur/QIIME™

Da keine Daten für die V3-V4 Region von mothur verfügbar sind, lässt sich der Vergleich der Datenbanken lediglich auf die V4-Region beziehen. Der Unterschied und der Einfluss, den die Datenbanken auf das Sequenzierergebnis haben, lassen sich anhand der Abb. 38 illustrieren. Die QIIME™ Datenbank liefert homogenere Ergebnisse und ist in der Lage alle 13 Genera der Positivkontrolle zu identifizieren. Die mothur Datenbank liefert hingegen nur 11 Genera und kann sogar 5 % der Reads nicht den richtigen Referenzbakterien zuordnen. Schlussfolgernd hat nicht nur die ausgewählte Region, sondern auch die verwendete Datenbank einen gravierenden Einfluss auf die Ergebnisse, die mit ihnen generiert werden. Diese Arbeit soll dazu beitragen, nachfolgende Autoren kritisch über diese Problematik zu informieren und eine grundlegende Basis für fundierte randomisierte Studien legen.

4.1.4.3 Möglichkeiten und Grenzen des NGS

Da es sich beim NGS um eine sensible, kostenintensive und anwenderbezogene Technik handelt, die extrem große Datenmengen generiert, wurden die Untersuchungen aus dieser Dissertation mit drei Probanden und je 22 Proben durchgeführt ($\Sigma n = 66$). Bei der Analyse der Ergebnisse stellte sich heraus, dass die Identifikation der Bakterien aufgrund der Limitation der 16S rDNA Taxonomie und ihren Eigenschaften nur bis zum Level der Gattungen zuverlässig möglich ist. Anhand der Positivkontrollen (bekannte Bakterien aus Tabelle 3) konnte festgestellt werden, dass die Fehlerquote bei der Bakterienbestimmung auf dem Level der Spezies und Subspezies erheblich zunahm. Mit technischem Fortschritt wird es in Zukunft sicherlich möglich sein, Analysen durchzuführen, welche auch andere Mikroorganismen, wie Viren, Pilze und Parasiten, mit einschließen (Metagenomik) sowie die Sensitivität der Methode maßgeblich zu verbessern. Ein weiterer Nachteil des NGS ist, dass es sich nur um ein semi-quantitatives Analyseinstrument handelt. Es lässt in diesem Fall durch die hohe Anzahl an Replikationszyklen keinen konkreten Rückschluss auf die bakterielle Ursprungskonzentrationen der Originalproben zu. Dies ist bis jetzt nur mit einer quantitativen Realtime-PCR möglich (Suzuki *et al.* 2004), jedoch nur für bereits bekannte, ausgewählte Bakterien und nicht für das Gesamtmikrobiom. Das NGS kann demnach nicht unterscheiden, ob es sich beim Sonnenblumenöl um ein quantitativ besseres Ziehmedium als beim NaCl (0,9 %) handelt, sondern nur die Bakterien im Verhältnis darstellen, wie sie in den Speichelp Proben vorhanden waren. Die Abbildung 50 zeigt, dass es nicht möglich ist, von der CFU auf Reads zu schließen. Ein weiterer kritischer Punkt ist, dass das NGS nicht in der Lage war, 3 von 30 nach MALDI-TOF MS identifizierten Bakterien (*Klebsiella*, *Micrococcus*, *Serratia*) zu verifizieren (Tab. 11). Grund dafür könnten jedoch unter anderem anwenderbezogene oder technische Fehler mit dem MALDI-TOF MS sein. Die Probandenmikrobiome haben trotz ihrer Ähnlichkeit eine individuelle Signatur und lassen sich den ursprünglichen Probanden zweifelsfrei zuweisen (Abb. 48, Abb. 49). Daher halten wir persönlich abschließend in Zukunft die forensische Untersuchung des individuellen oralen Mikrobioms auch in der Kriminaltechnik und für einsatzfähig. Diese Thematik des individuellen Mikrobioms ist derzeit Gegenstand weitreichender, wissenschaftlicher Forschung (Metcalf *et al.* 2017).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Vergleich der Ergebnisse anderer Autoren

4.2.1.1 Vergleich der Probandenmikrobiome mit anderen Autoren

Nasidze *et al.* haben 2009 in ihrer globalen Untersuchung zur geographischen Differenzierung des oralen Mikrobioms mittels Speichelproben erhebliche Unterschiede der oralen bakteriellen Besiedelung feststellen können. Für einen Probandenkreis von 10 bzw. 3 Personen wird die prozentuale Verteilung nach mengenmäßigem Vorkommen für die 11 häufigsten bakteriellen Gattungen absteigend angegeben:

Tabelle 12: Die 11 häufigsten bakteriellen Gattungen des oralen Mikrobioms

Nasidze <i>et al.</i> 2009/Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie (Deutschland, Summe aus n = 10 mit insgesamt 101 Gattungen)		Grießl, Domann <i>et al.</i> (Deutschland, Summe aus n = 3 mit insgesamt 85 Gattungen/Mittelwert aus Speichelproben, Proband A,B,C)	
1. <i>Streptococcus</i> :	26,32 %	1. <i>Prevotella</i> :	26,96 %
2. <i>Prevotella</i> :	16,36 %	2. <i>Streptococcus</i> :	19,04 %
3. <i>Rothia</i> :	14,63 %	3. <i>Veillonella</i> :	9,95 %
4. <i>Haemophilus</i> :	7,45 %	4. <i>Neisseria</i> :	8,69 %
5. <i>Neisseria</i> :	6,58 %	5. <i>Haemophilus</i> :	5,82 %
6. <i>Veillonella</i> :	5,89 %	6. <i>Fusobacterium</i> :	4,21 %
7. <i>Porphyromonas</i> :	3,38 %	7. <i>Actinomyces</i> :	3,46 %
8. <i>Fusobacterium</i> :	2,51 %	8. <i>Rothia</i> :	3,45 %
9. <i>Actinomyces</i> :	1,99 %	9. <i>Gemella</i> :	3,44 %
10. <i>Leptotrichia</i> :	1,65 %	10. <i>Porphyromonas</i> :	3,07 %
11. <i>Granulicatella</i> :	1,47 %	11. <i>Leptotrichia</i> :	2,78 %

Es ist davon auszugehen, dass nicht nur die geographische Region das orale Mikrobiom bestimmt (Nasidze *et al.* 2009), sondern auch andere Faktoren wie Alter, Ernährung, Lebensstil, Gesundheitszustand, orale Hygiene oder die Partnerwahl Einfluss auf die Verteilung des gesunden bakteriellen oralen Habitats haben. Unsere Ergebnisse decken sich in 10 von 11 Gattungen zu jenen von (Nasidze *et al.* 2009), die prozentuale Verteilung unterscheidet sich jedoch. Es gibt lediglich eine Abweichung

von *Granulicatella* bzw. *Gemella*. Die Summe aus der Studie von Griebl, Domann *et al.* beträgt 90,87 % [(Nasidze *et al.* 2009) 88,23 %]. Das bedeutet, dass rund 90 % des oralen Mikrobioms durch lediglich 11 bakterielle Gattungen gebildet werden.

4.2.1.2 Mögliches Potential der Transplantation des oralen Mikrobioms

In den letzten Jahren hat die Fäkal- bzw. Stuhl-Transplantation an stets größerer Bedeutung gewonnen. Bei Erkrankungen wie *Colitis ulcerosa*, *Morbus Crohn* oder *Clostridium difficile*-Infektionen ist die Übertragung des Darmmikrobioms gesunder Probanden in ein pathogen verändertes Habitat mit herausragend guten Ergebnissen veröffentlicht worden (Borody *et al.* 2013). Dabei konnten nachweislich die pathogenen Mikrobiome durch die Auseinandersetzung mit denen gesunder Probanden positiv beeinflusst oder kuriert werden. Da sich auch die oralen Mikrobiome gesunder sowie zahnloser Individuen oder Patienten mit Parodontitis maßgeblich unterscheiden, inspirieren die Ergebnisse der Fäkal-Transplantation im Sinne eines oralen Pendants bzw. einer Transplantation des gesunden oralen Mikrobioms (Pozhitkov *et al.* 2015). Eine Studie von Kort *et al.* 2014 untersuchte den Einfluss des intimen Küssens von 21 Paaren. Dabei wurden innerhalb von 10 s im Mittel 80 Millionen Bakterien übertragen, wovon der Großteil zuvor ausgewählte und mit einem Drink zugesetzte Probiotika wie *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* waren. Die Partner teilten ebenfalls ein ähnliches gemeinsames Mikrobiom. Zwar konnte unmittelbar nach einem intimen Kuss keine signifikante Veränderung der einzelnen Mikrobiome festgestellt werden, es änderte sich jedoch die Varietät mit der Zeit und Frequenz, in der Speichel untereinander ausgetauscht wurde (Kort *et al.* 2014). Es ist deshalb davon auszugehen, dass eine prinzipielle Transplantation des oralen Mikrobioms zwar möglich ist, jedoch ein hohes Frequenzintervall des zu transplantierenden Materials benötigt. Aus diesem Grund scheinen pharmazeutische Lutschpastillen zur Supplementation von oralen Probiotika geeignet. Erste Produkte wurden bereits vorgestellt, z. B. Präparate, die *Lactobacillus reuteri* enthalten, von welchem klinisch positive Studienergebnisse bei Parodontitis (Martin-Cabezas *et al.* 2016) sowie Schwangerschaftsgingivitis (Schlagenhauf *et al.* 2016) gezeigt werden konnten. Als orales Probiotikum ist *L. reuteri* in der Lage, das Wachstum von parodontalpathogenen Keimen zu hemmen (Vicario *et al.* 2013; Teughels *et al.* 2013).

4.2.2 Vergleich der Effektivität des Ölziehens mit den Ergebnissen anderer Autoren

Anand T.D. *et al.* beobachteten 2008 in ihrer Studie eine um 20 % reduzierte Bakterienanzahl in 40 Tagen mit der Nutzung von Sesamöl als Ziehmedium sowie eine

moderat antimikrobielle Aktivität gegenüber *S. mutans* und *L. acidophilus*. Die in der Literatur bekannten und verwendeten Techniken der Anzucht ausgewählter Bakterien, z. B. mit dem *S. mutans*-Kit, sind mit den Methoden dieser Dissertation nicht vergleichbar. Eine mögliche antimikrobielle Aktivität von Sonnenblumenöl ließ sich in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigen (Abb. 14).

4.2.2.1 Effektivität des Ölziehens gegen Candidiasis (Soor)

Sroisiri Theweeboon *et al.* bescheinigen 2011 vor allem dem Sonnenblumenöl im Biofilmodell eine sehr gute antimykotische Wirkung. Die Beobachtungen in (Abb. 17) scheinen diese These zu bestätigen. Da es sich jedoch nur um einen repräsentativen Auszug aus den Versuchstagen handelt und *Candida albicans* nur bei Proband C in ausreichender Menge kultivierbar war, ist diese Aussage nicht signifikant, sondern lediglich eine Beobachtung. Weiterführende Untersuchungen zu dieser These scheinen wissenschaftlich sinnvoll, da die opportunistische orale *Candida albicans*-Infektion (Candidiasis) vor allem bei Kindern, alten und immunsupprimierten Patienten gehäuft auftritt. Die entsprechenden systemischen antimykotischen Therapien, wie durch Amphotericin B, werden mit teils starken Risiken und Nebenwirkungen in Verbindung gebracht (Liu *et al.* 2017).

4.2.2.2 Interaktion von bakteriellen bzw. humanen Zellen und Öl

Sood *et al.* beschrieben 2014 unter anderem als zentralen Mechanismus des Ölziehens die Bindung von Öl an die bakterielle Zellmembran und den so aus der Mundhöhle herauslösenden Effekt. Auch soll das Ölziehen insbesondere mit Sesamöl die bakterielle Koaggregation und Plaquebildung behindern (Peedikayil *et al.* 2015). Es handelt sich hier jedoch um reine und umstrittene Theorien, die bisher nicht wissenschaftlich bestätigt werden konnten.

In diesem Zusammenhang konnte in dieser Arbeit lichtmikroskopisch durchaus eine Interaktion zwischen Ölmzellen und der bakteriellen bzw. Wirtszelle nachgewiesen werden (Abb. 30, Abb. 31).

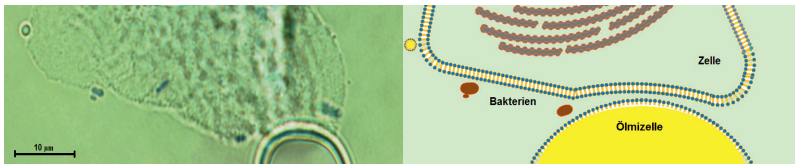


Abbildung 52: Interaktion Epithelzelle, Bakterien, Ölmizelle (Mikroskopie/Schema)

Diese Abbildung zeigt einen repräsentativen Ausschnitt mit maximaler optischer Vergrößerung des Keyence®, Biozero, BZ-8000 einer Ölziehprobe (Proband B), welche nach Giemsa 1:4 gefärbt wurde. Es ist bewusst ein Ausschnitt mit wenig Ölmizellen und Bakterien gewählt worden, um den Fokus auf einzelne Objekte besser nachvollziehen zu können. Es lässt sich die mit Bakterien (Stäbchen) besiedelte Epithelzelle sowie eine Adhärenz der Ölmizellen erkennen. Zusätzlich wird die Zellmembran leicht deformiert. Abbildung 31 kann nach dem Herauslösen des Öls optisch eine eindeutige Assoziation zwischen den Ölmizellen und der Zellmembran nachweisen. Es stellt sich die Frage, auf welcher Grundlage diese Interaktion beruht.

Die humane Epithelzellmembran besteht hauptsächlich aus Phospholipiden, Cholesterin sowie Glykoproteinen und Proteoglykanen (Welsch und Deller 2010). Das verwendete Sonnenblumenöl enthält dagegen hauptsächlich ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure (48–74 % Omega-6-Fettsäure), Ölsäure (14–40 % Omega-9-Fettsäure) aber auch Palmitinsäure (4–9 % gesättigte Fettsäure) und Stearinsäure (1–7 % gesättigte Fettsäure) (Caesar & Loretz GmbH). Das Öl bildet aufgrund der niedrigeren Oberflächenspannung lipophile Mizellen (Marchand *et al.* 2011).

Die Bindung von Ölmizellen und Epithel- oder bakterieller Zellmembran mit einer echten kovalenten Bindung zu erklären, wäre sicher unzutreffend, da solche Bindungen zwar möglich sind, jedoch einer katalytischen Reaktion (z. B. enzymatisch) bedürfen. Von fetthaltigen Dermatika ist bekannt, dass sie gut an der Haut haften und einziehen. Wir vermuten, dass die Assoziation von Öl und Zellen auf den relativ schwachen Wasserstoffbrückenbindungen beruhen. Da Sauerstoff durch seine hohe Elektronegativität von 3,5 (nach Allred Rochow) partiell negativ geladen ist, könnte eine Anziehung durch den partiell positiv geladenen Wasserstoff (Elektronegativität von 2,2 nach Allred Rochow) existieren (Abb. 53). Auch eine Bildung von schwachen Van-der-Waals Wechselwirkungen scheint möglich. Von Glykoproteinen wie Fibronectin ist derzeit bekannt, dass es Adhäsion zu Zellen über die Van-der-Waals-Kraft hervorruft (Kendall und Roberts 2015). Die folgende Abbildung 53 verdeutlicht unsere Hypothese mit den Hauptbestandteilen des Öls und der Zellmembran schematisch.

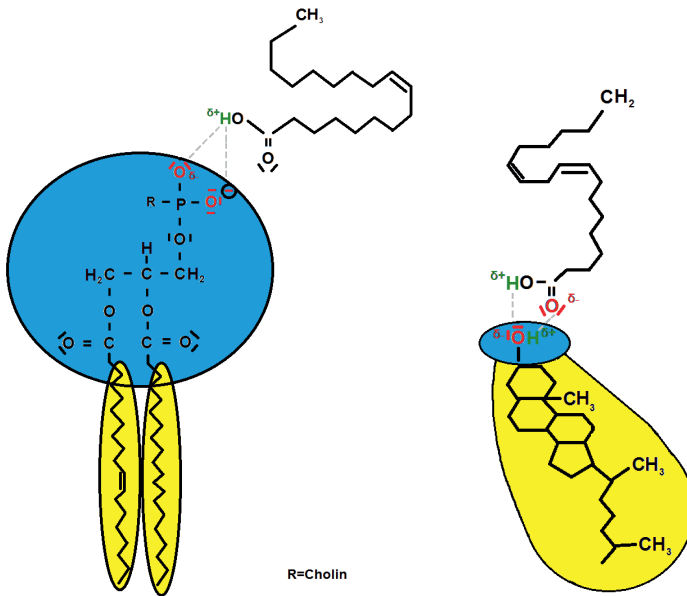


Abbildung 53: Theoretische Darstellung der Interaktion von Phosphatidylcholin-Ölsäure (links)/Cholesterin-Linolsäure (rechts) modifiziert nach (Horn 2009)

Prinzipiell halten wir auch eine Assoziation von Öl und bakterieller Membran (grampositive und gramnegative Zellwand) für wahrscheinlich. Zusätzlich könnten die beim Ölziehen erhöhte Saponifikation und Emulsionsbildung (Verseifung und erhöhte Oberflächenbildung) die oben beschriebenen Effekte verstärken.

Andere Theorien, wie eine Behinderung der bakteriellen Koaggregation (Sood *et al.* 2014) oder sogar deren Lyse (Peedikayil *et al.* 2015) können wir in dieser Arbeit nicht nachvollziehen oder belegen. Ebenso konnten zahnaufhellende Effekte nach Shanbhag 2017 weder bestätigt noch widerlegt werden.

Die Probanden beschrieben einen angenehmen, anhaltenden, auskleidenden Peeling-Effekt der Mundhöhle nach dem Ölziehen. Aus diesem Grund und der in den Ergebnissen dokumentierten erhöhten Speichelproduktion (Abb. 37), können wir explizit eine Empfehlung des Ölziehens für Patienten mit den Krankheitsbildern der Hyposalivation bzw. Xerostomie und Burning-Mouth-Syndrom (Grushka 1987) aussprechen. Dabei sollte jedoch kalt gepresstes Öl verwendet werden, da z. B. erhitztem Kokosöl karzinogene Eigenschaften nachgewiesen wurden (Srivastava *et al.* 2010).

4.2.2.3 Unterschiede von NaCl (0,9 %) und Öl als Ziehmedium

Die Kontamination der Ziehmedien mit bakterieller DNA ist erstaunlicherweise bei Öl um ein Drittel niedriger als bei NaCl (Abb. 41). Dies spricht für die hohe Reinheit des verwendeten Sonnenblumenöls. Die Quantität der Bakterien, die nach dem Ziehen in den Medien (NaCl/Öl) gefunden wurde, ist sehr ähnlich, mit der Ausnahme, dass in Öl 7,7 % mehr *Porphyromonas* aus der Mock-Community gefunden werden konnte als in NaCl (Abb. 37). Da *Porphyromonas gingivalis* ein hoch pathogenes Bakterium mit Assoziation zur Parodontitis ist (Dashper *et al.* 2011), ist diese Erkenntnis zur Theorie des Ölziehens von besonderem Interesse. Eine erhöhte Aufnahme von *Porphyromonas* in den Ziehproben lässt sich anhand der Ergebnisse der Probanden, welche nicht unter einer Parodontitis litten, jedoch nicht bestätigen.

Das Sonnenblumenöl induzierte während des Ziehens eine erhöhte Speichelproduktion (Abb. 37). Dies könnte mit einer Aktivierung des Parasympathikus durch Assoziation des Öls als Nahrungsmittel in Zusammenhang stehen. Die genauen Mechanismen zur Speichelstimulation durch den Geschmackssinn sind jedoch noch nicht tiefgründig erforscht (Spielman 1990). Die erhöhte Spülfunktion der Mundhöhle kann daraus theoretisch mit einer gesteigerten „Clearence“ (Entfernung von mehr Bakterien) einhergehen.

Auch konnten aus den Ölziehproben mehr Mikroorganismen kultiviert werden, was für eine höhere bakterielle Aufnahmekapazität als beim NaCl-Ziehen spricht (Abb. 32, Abb. 33, Abb. 35, Abb. 36). Das Öl scheint bei der potentiellen Aufnahme von *Candida albicans* und *Klebsiella oxytoca* dem NaCl (0,9 %) klar überlegen zu sein (Abb. 16, Abb. 17, Abb. 18, Abb. 19).

4.2.3 Eruierung möglicher Risiken des Ölziehens

Das in der Literatur beschriebene Risiko der lipoiden Aspirationspneumonie beim Ölziehen (Kim *et al.* 2014; Kuroyama *et al.* 2015) ist nachvollziehbar, da das Volumen durch die erhöhte Speichelproduktion über 15 min erheblich zunimmt und ein Verschlucken und Aspirieren der Öl-Speichel-Emulsion daraus resultieren könnte. Die bei der Aspiration des Öls resultierende Pneumonie, welche durch die im Öl enthaltene massive Anzahl an gelösten, nicht abgetöteten Bakterien verursacht werden könnte (Imsand *et al.* 2002), ist nachvollziehbar. Aus diesem Grund ist die beschriebene Methode des Ölziehens nur für motorisch geübte Personen praktikabel. Die in der Literatur beschriebene Altersfreigabe für Kinder ab fünf Jahren (Shanbhag 2017) ist daher selbst mit einem reduzierten Ziehvolumen durchaus als kritisch zu bewerten.

4.3 Schlussfolgerungen

Das Ölziehen mit Sonnenblumenöl scheint in Anbetracht der geringen Risiken eine wirkungsvolle, ergänzende orale Hygienemaßnahme zu sein. Es ist davon auszugehen, dass die unterschiedlichen verwendeten Öle variierende Effekte auf das orale Mikrobiom bzw. dessen Reduktion haben. Grießl, Domann *et al.* konnten eine höhere Bakterienanzahl im Öl (Abb. 32), eine gesteigerte Speichelproduktion beim Ölziehen im Vergleich zum NaCl (0,9%)-Ziehen (Abb. 37) sowie eine Interaktion zur eukaryotischen und prokaryotischen Zellmembran mit dem Sonnenblumenöl (Abb. 30, Abb. 31) im Vergleich zur Negativkontrolle mit NaCl (Abb. 29) nachweisen. Obwohl das Sonnenblumenöl in der Lage ist, das gesamte Keimspektrum des oralen Mikrobioms zu absorbieren (Abb. 39), scheint es einen besonderen Effekt auf *Candida albicans* (Abb. 17) und *Porphyromonas gingivalis* (Abb. 39) zu haben.

Mit der vermehrten Zunahme an Untersuchungen auf Grundlage des Next-Generation-Sequencings und aktueller Bioinformatik bedarf es global kritischer Auseinandersetzung und verbesserter Standardisierung, wie das Bereitstellen genormter Positivkontrollen (Mock-Communitys), Konsens über die Vor- und Nachteile der hypervariablen 16S rDNA-Regionen sowie der Pflege und Erweiterung internationaler bakterieller Genomdatenbanken.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit etablierten Methoden zur Untersuchung des oralen Mikrobioms sowie speichelhaltiger (Ölzieh-) Proben sind in der Lage, die gesamte bakterielle Flora repräsentativ darzustellen. Dies ist derzeit jedoch nur auf Basis der gezielten Auswahl der hypervariablen Region der 16S rDNA auf dem Level von Gattungen exakt möglich. Die taxonomische und bioinformatische Betrachtung der generierten Daten mittels NGS hat maßgeblichen Einfluss auf die Ergebnisse, die mit ihnen erzielt werden. Obwohl über 90 % aller Bakterien des oralen Mikrobioms lediglich durch 11 Gattungen charakterisiert werden, hat jeder Proband dieser Arbeit ein einzigartiges orales Mikrobiom und ist anhand dessen klar identifizierbar. Mit zunehmender Genauigkeit ist diese Sequenzieretechnik auch für kriminalistische und forensische Untersuchungen in Zukunft wohl sicher einsetzbar.

Zur Optimierung der oralen Sequenzierung sollte eine standardisierte Mock-Community sowie Konsens über die verwendeten Sequenzierregionen der 16S rDNA und der Datenbanken Einzug halten. Kombiniert mit dem technischen Fortschritt ist das Ziel dabei die orale Metagenomanalyse.

Als orales Ziehmedium ist Sonnenblumenöl in der Lage, deutlich mehr Bakterien als NaCl (0,9 %) aufzunehmen und die Speichelproduktion signifikant zu steigern. Zudem kann es das gesamte orale Mikrobiom im Vergleich mit Speichel reflektieren. Sonnenblumenöl wirkt dabei nicht antimikrobiell, sondern scheint eine interaktive Bindung zwischen eukaryotischen und bakteriellen Zellmembranen einzugehen. Zusätzlich scheint es einen besonderen Einfluss von Sonnenblumenöl auf *Candida albicans* und *Porphyromonas gingivalis* zu geben. Weiterführende klinische Untersuchungen der Effektivität des Ölziehens auf die Krankheitsbilder von Soor und den verschiedenen Formen der Parodontitis sind demzufolge potentiell vielversprechend. Da es sich langanhaltend über die *Mucosa* der Mundhöhle legt, kann das Ölziehen für Menschen mit verminderter oder versiegtter Speichelproduktion (Hyposalivation, Xerostomie) und zur Linderung des Burning-Mouth-Syndroms empfohlen werden. Das Risiko der Öl-assoziierten Aspirationspneumonie sollte jedoch individuell bezüglich Alter und motorischen Fähigkeiten mit beachtet werden.

Es ist davon auszugehen, dass die verschiedenen pflanzlichen Öle durchaus einen unterschiedlichen Effekt auf Bakterien haben. Da das Mikrobiom ständigen Schwankungen durch äußere Einflüsse, sowie einer raschen Vermehrungsrate und Koaggregation der Bakterien unterliegt, ist ein langanhaltender Effekt nach dem Ölziehen und ob es als Kur oder täglich praktiziert werden kann, fraglich. Das Ölziehen

sollte dabei nicht als ersetzende, sondern als ergänzende orale Hygienemaßnahme betrachtet werden.

Ob das Ölziehen weltweit als kostengünstige und effektive Maßnahme zur Verbesserung der Mundgesundheit Einzug erhält, wird durch die Ergebnisse weiterführender klinischer Studien, die verschiedene Öle und Krankheitsparameter mit einbeziehen, bestimmt.

6 Summary

The arranged methods of this thesis to the high-resolution examination of the oral microbiome and oil pulling samples on the basis of saliva are able to reflect the whole bacterial flora. Currently, the technological processes are only able to provide good results with the expedient choice of the range of the hyper variable 16S rDNA region on the level of bacterial genera. The next-generation sequencing and its different viewing with taxonomical methods and bioinformatics produce several results using variable parameters. Although 90 % of the oral microbiome is based on 11 different bacterial genera, every human has a unique oral microbiome by which he can be identified. Even for crime detection and forensics this conclusion could be an increment of well known methods.

To optimize the NGS technology, it is necessary to create a standardized mock community for oral samples and to agree on the different bioinformatical databases. This should clear the way of metagenomic analysis for the future.

In summary, this was the first comprehensive study which examined the microbiota in oil pulling samples. The used sunflower seed oil is able to absorb significantly more bacteria than the negative control with saline and is able to increase the saliva production. Sunflower seed oil reflects the whole oral microbiome, has no antimicrobial activity, and seems to enwrap eukaryotic and bacterial cell membranes. Additionally, there is a particular effect for *Candida albicans* and *Porphyromonas gingivalis*. Further studies dealing with the observation of oil pulling and its effects on diseases like candidiasis and periodontitis have good prospects. For patients with hyposalivation and xerostomia oil pulling could be a beneficial treatment thanks to its lining/absorbing effect to the oral mucosa and its ability to alleviate the burning mouth syndrome. With the suggestion of oil pulling, age and motor skills have to be considered to reduce the risk of aspiration and the resulting oil associated recurrent lipid pneumonia.

Taking a look at literature, one will realize that using different oils for oil pulling has several different effects. Consequently, the oral microbiome is in a constant state of flux with a high bacterial turnover rate and co-aggregation. There are no insights concerning the questions if oil pulling has a sustainable effect on the microbiome and if it is a treatment for every-day use or just as a temporary treatment.

Oil pulling as an ancient ayurvedic therapy seems to be a cheap and effective method for maintaining oral health, to reduce oral inflammation, and distant side inflammation. To confirm this thesis terminally, more continuative and randomized studies are needed, especially concerning its influence on health and disease.

7 Abkürzungsverzeichnis

&	und
x	Mal
Σ	Summe
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AGE	Advanced Glycation Endproduct
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare (basepairs)
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cap	1,5 ml Eppendorfgefäß
CFU	koloniebildende Einheit (colony forming unit)
CHOCV	Kochblut-Agar 8 % (Schokoladenagar)
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COLS	Columbia-Agar 5 % Schafblut (columbia agar with 5 % sheep-blood)
DMFT	Decayed/Missing/Filled Teeth
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	double strang
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
F	forward
g	Erdgravitation 9,807 m/s ²
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde (hour)
H ₂ O	Oxidant (Wasser)
Ig	Immunglobulin
JLU	Justus-Liebig-Universität
kb	kilobase
LB	Lysogeny Broth
m	Meter
mA	Milliampere
MAC	MacConkey-Agar
min	Minute
ml	Milliliter
n	Anzahl, Summe
N	normal
NaCl	0,9 %iges Natriumchlorid (physiologische Kochsalzlösung)
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NGF	Nerve Growth Factor
NGS	Next-Generation-Sequencing
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORG	Objective Organoleptic Breath Assessment

OTU	Operational Taxonomic Unit
p	pico
p	Signifikanzwert
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase-chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
ppm	parts per million
R	reverse
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur (room temperature)
s	Sekunde (second)
SAB	Sabouraud-Dextrose-Agar
T	Thymin
tägl.	täglich
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan (THAM)
U	units
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
v. A.	vor Allem
Verd.	Verdünnung (Verdünnungsstufe)
Vol.	Volumen

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Parodontitis-assoziierte Keime (Baron 1996; Dashper <i>et al.</i> 2011; (Fine <i>et al.</i> 2007)	8
Tabelle 2: Probandenkollektiv	15
Tabelle 3: Mock-Community und Stammsammlungen (ÜNK)	18
Tabelle 4: Positiv-/Negativkontrollen	26
Tabelle 5: Ansatz der Prokaryonten PCR.....	32
Tabelle 6: Ansatz der Amplikon-I PCR für die V4-Region	33
Tabelle 7: Ansatz der Amplikon-I PCR für die V3–V4-Region	34
Tabelle 8: Ansatz der Amplikon-II PCR für die V3–V4/V4-Regionen	35
Tabelle 9: Indexprimer für die Amplikon-II PCR	35
Tabelle 10: 16S rDNA Taxonomie (Yarza <i>et al.</i> 2014).....	40
Tabelle 11: Keimbestimmung der oralen Flora mittels MALDI-TOF MS	44
Tabelle 12: Die 11 häufigsten bakteriellen Gattungen des oralen Mikrobioms	79
Tabelle 13: Tabelle zur Berechnung der Speichelmenge und CFU.....	99
Tabelle 14: Tabelle zur Berechnung der Speichelmenge und Reads.....	100
Tabelle 15: Zusammenfassung der Bakterien nach Gattung, alphabetisch, Anteile im Speichel, Proband: A,B,C, Ergebnisse des NGS	101

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Exemplarische Darstellung oraler NaCl- (links)/Ölziehprobe (rechts), Proband B.....	23
Abbildung 2: Versuchsablauf Hauptversuch, Probengewinnung	24
Abbildung 3: Agilent®, exemplarische Darstellung (Probe 1, V3–V4-Region nach Amplikon-II PCR)	30
Abbildung 4: Programm für die Prokaryonten PCR	32
Abbildung 5: Programm für Amplikon-I PCR	33
Abbildung 6: Programm für Amplikon-I PCR	34
Abbildung 7: Programm für Amplikon-II (Index-PCR)	36
Abbildung 8: Binden der mit DNA beladenen Beads an einen Magneten	38
Abbildung 9: Illumina® MiSeq™	40
Abbildung 10: Library Preparation modifiziert nach Illumina®	41
Abbildung 11: Cluster Generation modifiziert nach Illumina®	42
Abbildung 12: Sequencing modifiziert nach Illumina®	42
Abbildung 13: Data Analysis modifiziert nach Illumina®	42
Abbildung 14: Ölziehprobe nach 1 h, 5 h, 26 h (COLS).....	43
Abbildung 15: Verdünnungsreihe NaCl-Ziehprobe: CFU Verd. 10^0 – 10^{-7} (COLS)	43
Abbildung 16: <i>Candida albicans</i> (SAB-Agar), NaCl (0,9 %) vorher/nachher, Proband C	46
Abbildung 17: <i>Candida albicans</i> (SAB-Agar), Öl vorher/nachher, Proband C.....	46
Abbildung 18: <i>Klebsiella oxytoca</i> (MAC-Agar), NaCl (0,9 %) vorher/nachher, Proband C	47
Abbildung 19: <i>Klebsiella oxytoca</i> (MAC-Agar), Öl vorher/nachher, Proband C.....	47
Abbildung 20: Ölziehprobe (links), NaCl-Ziehprobe (rechts) zentrifugiert, 1,5 ml, 13.300 rpm, 15 min, RT	48
Abbildung 21: DNA-Extraktion aus Öl mittels 70 %igem Ethanol (1), 100 %igem Ethanol (2), Chloroform:Isoamylalkohol 24:1 (3)	48
Abbildung 22: PCR mit Extrakten aus Phenol-Chloroform-Extraktion.....	49
Abbildung 23: Ölpellet, DNA-Extraktion.....	50
Abbildung 24: DNA-Gehalt Ölziehpellet (links)/Überstand (rechts).....	51
Abbildung 25: Ölziehpellet, PCR.....	51
Abbildung 26: MO BIO® PowerLyzer-Kit links mit Enzymen/rechts ohne Enzyme.....	52
Abbildung 27: Verschiedene Extraktionsmethoden, Vergleich nach Amplikon-I PCR..	52
Abbildung 28: Speichel nativ, Giemsa 1:4 (60 × Vergrößerung), Proband B	53
Abbildung 29: NaCl (0,9 %)-Ziehprobe, Giemsa 1:4 (60 × Vergrößerung), Proband B	54
Abbildung 30: Ölziehprobe, Giemsa, 1:4 (60 × Vergrößerung), Proband B	54
Abbildung 31: Ölziehprobe, Methanol fixiert, Giemsa 1:4 (60 × Vergrößerung), Proband B.....	55
Abbildung 32: CFU/Gesamtvolumen, Mittelwert aus 3 Tagen (COLS)	56
Abbildung 33: Halblogarithmische Darstellung der CFU/ml. Proben aufgeschlüsselt nach Versuchstagen (COLS)	57
Abbildung 34: Reduktion durch NaCl-/Ölziehen in Prozent	58
Abbildung 35: CFU in Ziehproben, hochgerechnet auf die Gesamtprobenvolumina, halblogarithmische Darstellung	59
Abbildung 36: CFU/ml Speichel hochgerechnet auf das reine Speichelvolumen, halblogarithmische Darstellung	60

Abbildung 37: Speichelvolumen in den Ziehproben	61
Abbildung 38: Vergleich der Datenbanken über die Mock-Community	62
Abbildung 39: Vergleich von NaCl (0,9 %) und Öl über die Mock-Community (V4, QIIME™) nach Gattung	63
Abbildung 40: Negativkontrollen, Vergleich der Medien (V4, QIIME™)	64
Abbildung 41: Vergleich der generierten Reads aus den Negativkontrollen mit verschiedenen Datenbanken und Regionen	65
Abbildung 42: Gesamtheit der oralen Probandenmikrobiome, n = 3 je Speichelprobe (V4, QIIME™)	66
Abbildung 43: Sauerstofftoleranz der Probandenmikrobiome (V4, QIIME™)	67
Abbildung 44: Gramverhalten der Probandenmikrobiome (V4, QIIME™)	68
Abbildung 45: Vergleich der Medien je Proband nach Gattung (V4, QIIME™)	69
Abbildung 46: Vergleich der Medien je Proband nach Atmungsverhalten (V4, QIIME™)	70
Abbildung 47: Vergleich der Medien je Proband nach Gramverhalten (V4, QIIME™) ..	71
Abbildung 48: Dreidimensionale Darstellung der Probandenmikrobiome inklusive Ziehproben (V4, QIIME™), PCA	72
Abbildung 49: Darstellung des oralen Mikrobioms mittels Barcode, Proband A, B, C (Speichel)	72
Abbildung 50: Vergleich von CFU und Reads im zeitlichen Verlauf	73
Abbildung 51: Readcounts in Medien, Vergleich NaCl (0,9 %) und Öl, Mittelwert aus drei Proben (V4, QIIME™)	74
Abbildung 52: Interaktion Epithelzelle, Bakterien, Ölmizelle (Mikroskopie/Schema)	81
Abbildung 53: Theoretische Darstellung der Interaktion von Phosphatidylcholin-Ölsäure (links)/Cholesterin-Linolsäure (rechts) modifiziert nach (Horn 2009)	83

10 Literaturverzeichnis

1. Ahrens, Wolfgang; Pohlabeln, Hermann; Foraita, Ronja; Nelis, Mari; Lagiou, Pagona; Lagiou, Areti *et al.* (2014): Oral health, dental care and mouthwash associated with upper aerodigestive tract cancer risk in Europe: the ARCADE study. In: *Oral oncology* 50 (6), S. 616–625. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2014.03.001.
2. Anand T.D. *et al.* (2008): Effekt of oil-pulling on dental caries causing bacteria. In: *Afr J Microbiol* 2008 (2), S. 63–66.
3. Arendorf, T. M.; Walker, D. M. (1979): Oral candidal populations in health and disease. In: *British dental journal* 147 (10), S. 267–272.
4. Asokan, S.; Rathana, J.; Muthu, M. S.; Rathana, Prabhu V.; Emmadi, P. (2008): Effect of oil pulling on Streptococcus mutans count in plaque and saliva using Dentocult SM Strip mutans test: a randomized, controlled, triple-blind study. In: *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* 26 (1), S. 12–17.
5. Asokan, Sharath; Emmadi, Pamela; Chamundeswari, Raghuraman (2009): Effect of oil pulling on plaque induced gingivitis: a randomized, controlled, triple-blind study. In: *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research* 20 (1), S. 47–51.
6. Asokan, Sharath; Kumar, R. Saravana; Emmadi, Pamela; Raghuraman, R.; Sivakumar, N. (2011a): Effect of oil pulling on halitosis and microorganisms causing halitosis: a randomized controlled pilot trial. In: *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* 29 (2), S. 90–94. DOI: 10.4103/0970-4388.84678.
7. Asokan, Sharath; Rathinasamy, T. K.; Inbamani, N.; Menon, Thangam; Kumar, S. Senthil; Emmadi, Pamela; Raghuraman, R. (2011b): Mechanism of oil-pulling therapy - in vitro study. In: *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research* 22 (1), S. 34–37. DOI: 10.4103/0970-9290.79971.
8. Aumüller, Gerhard (2007): Anatomie. 208 Tabellen. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
9. Baron, Samuel (1996): Medical microbiology. 4th ed. Galveston, Tex.: University of Texas Medical Branch at Galveston.
10. Benninghoff, Alfred; Drenckhahn, Detlev; Benninghoff-Drenckhahn (Hg.) (2008): Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem ; [Online-Zugang + interaktive Extras www.studentconsult.de]. 17., durchges. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer (Anatomie, makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie / Benninghoff; Drenckhahn ; Bd. 1).
11. Borody, Thomas J.; Paramsothy, Sudarshan; Agrawal, Gaurav (2013): Fecal microbiota transplantation: indications, methods, evidence, and future directions. In: *Current gastroenterology reports* 15 (8), S. 337. DOI: 10.1007/s11894-013-0337-1.
12. Caporaso, J. Gregory; Kuczynski, Justin; Stombaugh, Jesse; Bittinger, Kyle; Bushman, Frederic D.; Costello, Elizabeth K. *et al.* (2010): QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. In: *Nature methods* 7 (5), S. 335–336. DOI: 10.1038/nmeth.f.303.
13. Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytical biochemistry* 162 (1), S. 156–159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.
14. Dany, S. S.; Mohanty, P.; Tangade, P.; Rajput, P.; Batra, M. (2015): Efficacy of 0.25% Lemongrass Oil Mouthwash: A Three Arm Prospective Parallel Clinical Study. In: *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 9 (10), ZC13-7. DOI: 10.7860/JCDR/2015/14465.6581.

15. Dashper, S. G.; Seers, C. A.; Tan, K. H.; Reynolds, E. C. (2011): Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. In: *Journal of dental research* 90 (6), S. 691–703. DOI: 10.1177/0022034510385242.
16. Dawes, C. (2004): How Much Saliva Is Enough for Avoidance of Xerostomia? In: *Caries Res* 38 (3), S. 236–240. DOI: 10.1159/000077760.
17. Dewhirst, Floyd E.; Chen, Tuste; Izard, Jacques; Paster, Bruce J.; Tanner, Anne C. R.; Yu, Wen-Han *et al.* (2010): The human oral microbiome. In: *Journal of bacteriology* 192 (19), S. 5002–5017. DOI: 10.1128/JB.00542-10.
18. Drenckhahn, Detlev; Asan, Esther; Benninghoff, Alfred; Benninghoff-Drenckhahn (Hg.) (2004): Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. 16., völlig neu bearb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer (Anatomie, makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie / Benninghoff; Drenckhahn ; Bd. 2).
19. Edgar, Robert C. (2010): Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (19), S. 2460–2461. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq461.
20. Fine, Daniel H.; Markowitz, Kenneth; Furgang, David; Fairlie, Karen; Ferrandiz, Javier; Nasri, Cebile *et al.* (2007): *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. In: *Journal of clinical microbiology* 45 (12), S. 3859–3869. DOI: 10.1128/JCM.00653-07.
21. Flötra, Leiv; Gjermo, P. E.R.; Rølla, Gunnar; Waerhaug, Jens (1971): Side effects of chlorhexidine mouth washes. In: *Eur J Oral Sci* 79 (2), S. 119–125. DOI: 10.1111/j.1600-0722.1971.tb02001.x.
22. Furuta, Michiko; Liu, An; Shinagawa, Takashi; Takeuchi, Kenji; Takeshita, Toru; Shimazaki, Yoshihiro; Yamashita, Yoshihisa (2016): Tooth loss and metabolic syndrome in middle-aged Japanese adults. In: *Journal of clinical periodontology* 43 (6), S. 482–491. DOI: 10.1111/jcpe.12523.
23. Gbinigie, Oghenekome; Onakpoya, Igbo; Spencer, Elizabeth; McCall MacBain, Marcy; Heneghan, Carl (2016): Effect of oil pulling in promoting oro dental hygiene: A systematic review of randomized clinical trials. In: *Complementary therapies in medicine* 26, S. 47–54. DOI: 10.1016/j.ctim.2016.02.011.
24. Ghannoum, Mahmoud A.; Jurevic, Richard J.; Mukherjee, Pranab K.; Cui, Fan; Sikaroodi, Masoumeh; Naqvi, Ammar; Gillevet, Patrick M. (2010): Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. In: *PLoS pathogens* 6 (1), e1000713. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000713.
25. Grossi, S. G.; Genco, R. J. (1998): Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. In: *Annals of periodontology* 3 (1), S. 51–61. DOI: 10.1902/annals.1998.3.1.51.
26. Grushka, M. (1987): Clinical features of burning mouth syndrome. In: *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 63 (1), S. 30–36.
27. Guo, S.; Dipietro, L. A. (2010): Factors affecting wound healing. In: *Journal of dental research* 89 (3), S. 219–229. DOI: 10.1177/0022034509359125.
28. Haas, Brian J.; Gevers, Dirk; Earl, Ashlee M.; Feldgarden, Mike; Ward, Doyle V.; Giannoukos, Georgia *et al.* (2011): Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. In: *Genome research* 21 (3), S. 494–504. DOI: 10.1101/gr.112730.110.
29. Hellwig, Elmar; Klimek, Joachim; Attin, Thomas (2013): Einführung in die Zahnerhaltung. Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie; mit 60 Tabellen. 6., überarb. Aufl. Köln: Dt. Ärzte-Verl.
30. Horn, Florian (2009): Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium. 4., aktualis. u. erw. Aufl. Stuttgart, New York NY: Thieme.

31. Imsand, M.; Janssens, J-P; Auckenthaler, R.; Mojon, P.; Budtz-Jorgensen, E. (2002): Bronchopneumonia and oral health in hospitalized older patients. A pilot study. In: *Gerodontology* 19 (2), S. 66–72. DOI: 10.1111/j.1741-2358.2002.00066.x.
32. J. J. Zambon et al (1997). In: *Dent. Res. Spec. Iss.* (abstr. 3159), S. 408.
33. Jauhari, Deepika; Srivastava, Nikhil; Rana, Vivek; Chandna, Preetika (2015): Comparative Evaluation of the Effects of Fluoride Mouthrinse, Herbal Mouthrinse and Oil Pulling on the Caries Activity and Streptococcus mutans Count using Oratest and Dentocult SM Strip Mutans Kit. In: *International journal of clinical pediatric dentistry* 8 (2), S. 114–118. DOI: 10.5005/jp-journals-10005-1295.
34. Jockel-Schneider, Yvonne; Gossner, Sophia K.; Petersen, Nicole; Stolzel, Peggy; Hagele, Florian; Schweiggert, Ralf Martin *et al.* (2016): Stimulation of the nitrate-nitrite-NO-metabolism by repeated lettuce juice consumption decreases gingival inflammation in periodontal recall patients: a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. In: *Journal of clinical periodontology* 43 (7), S. 603–608. DOI: 10.1111/jcpe.12542.
35. Jordan, Rainer A.; Bodechtel, Constanze; Hertrampf, Katrin; Hoffmann, Thomas; Kocher, Thomas; Nitschke, Ina *et al.* (2014): The Fifth German Oral Health Study (Funfte Deutsche Mundgesundheitsstudie, DMS V) - rationale, design, and methods. In: *BMC oral health* 14, S. 161. DOI: 10.1186/1472-6831-14-161.
36. Karas, Michael.; Bachmann, Doris.; Hillenkamp, Franz. (1985): Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. In: *Anal. Chem.* 57 (14), S. 2935–2939. DOI: 10.1021/ac00291a042.
37. Kaufman, Herbert E.; Azcuy, Ann M.; Varnell, Emily D.; Sloop, Gregory D.; Thompson, Hilary W.; Hill, James M. (2005): HSV-1 DNA in tears and saliva of normal adults. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 46 (1), S. 241–247. DOI: 10.1167/iovs.04-0614.
38. Kaushik, Mamta; Reddy, Pallavi; Sharma, Roshni; Udameshi, Pooja; Mehra, Neha; Marwaha, Aditya (2016): The Effect of Coconut Oil pulling on Streptococcus mutans Count in Saliva in Comparison with Chlorhexidine Mouthwash. In: *The journal of contemporary dental practice* 17 (1), S. 38–41.
39. Kendall, K.; Roberts, A. D. (2015): van der Waals forces influencing adhesion of cells. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 370 (1661), S. 20140078. DOI: 10.1098/rstb.2014.0078.
40. Kim, Jae Yeol; Jung, Jae Woo; Choi, Jae Chol; Shin, Jong Wook; Park, In Won; Choi, Byoung Whui (2014): Recurrent lipid pneumonia associated with oil pulling. In: *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 18 (2), S. 251–252. DOI: 10.5588/ijtld.13.0852.
41. Kinane, D. F. (1998): Periodontal diseases' contributions to cardiovascular disease: an overview of potential mechanisms. In: *Annals of periodontology* 3 (1), S. 142–150. DOI: 10.1902/annals.1998.3.1.142.
42. Knox, K. W.; Hunter, N. (1991): The role of oral bacteria in the pathogenesis of infective endocarditis. In: *Australian dental journal* 36 (4), S. 286–292.
43. König KG, Goldmann: Karies und Kariesprophylaxe. In: *München* 1971.
44. Kort, Remco; Caspers, Martien; van de Graaf, Astrid; van Egmond, Wim; Keijser, Bart; Roeselers, Guus (2014): Shaping the oral microbiota through intimate kissing. In: *Microbiome* 2, S. 41. DOI: 10.1186/2049-2618-2-41.
45. Kuroyama, Muneyoshi; Kagawa, Hiroyuki; Kitada, Seigo; Maekura, Ryoji; Mori, Masahide; Hirano, Hiroshi (2015): Exogenous lipid pneumonia caused by repeated sesame oil pulling: a report of two cases. In: *BMC pulmonary medicine* 15, S. 135. DOI: 10.1186/s12890-015-0134-8.

46. Liu, M.; Chen, M.; Yang, Z. (2017): Design of amphotericin B oral formulation for antifungal therapy. In: *Drug delivery* 24 (1), S. 1–9. DOI: 10.1080/10717544.2016.1225852.
47. Loe, H.; Von der Fehr, F R; Schiott, C. R. (1972): Inhibition of experimental caries by plaque prevention. The effect of chlorhexidine mouthrinses. In: *Scandinavian journal of dental research* 80 (1), S. 1–9.
48. Marchand, Antonin; Weijs, Joost H.; Snoeijer, Jacco H.; Andreotti, Bruno (2011): Why is surface tension a force parallel to the interface? In: *American Journal of Physics* 79 (10), S. 999–1008. DOI: 10.1119/1.3619866.
49. Marsh, Philip; Martin, Michael V. (2003): *Orale Mikrobiologie*. Mit 60 Tab. Stuttgart u.a.: Thieme.
50. Martin-Cabezas, Rodrigo; Davideau, Jean-Luc; Tenenbaum, Henri; Huck, Olivier (2016): Clinical efficacy of probiotics as an adjunctive therapy to non-surgical periodontal treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. In: *Journal of clinical periodontology* 43 (6), S. 520–530. DOI: 10.1111/jcpe.12545.
51. Masella, Andre P.; Bartram, Andrea K.; Truszkowski, Jakub M.; Brown, Daniel G.; Neufeld, Josh D. (2012): PANDaseq: paired-end assembler for illumina sequences. In: *BMC bioinformatics* 13, S. 31. DOI: 10.1186/1471-2105-13-31.
52. Metcalf, Jessica L.; Xu, Zhenjiang Z.; Bouslimani, Amina; Dorrestein, Pieter; Carter, David O.; Knight, Rob (2017): Microbiome Tools for Forensic Science. In: *Trends in biotechnology* 35 (9), S. 814–823. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.03.006.
53. Nakatsuji, Teruaki; Kao, Mandy C.; Fang, Jia-You; Zouboulis, Christos C.; Zhang, Liangfang; Gallo, Richard L.; Huang, Chun-Ming (2009): Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. In: *The Journal of investigative dermatology* 129 (10), S. 2480–2488. DOI: 10.1038/jid.2009.93.
54. Nasidze, Ivan; Li, Jing; Quinque, Dominique; Tang, Kun; Stoneking, Mark (2009): Global diversity in the human salivary microbiome. In: *Genome research* 19 (4), S. 636–643. DOI: 10.1101/gr.084616.108.
55. Offenbacher, S.; Katz, V.; Fertik, G.; Collins, J.; Boyd, D.; Maynor, G. *et al.* (1996): Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. In: *Journal of periodontology* 67 (10 Suppl), S. 1103–1113. DOI: 10.1902/jop.1996.67.10s.1103.
56. Page, R. C.; Kornman, K. S. (1997): The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. In: *Periodontology 2000* 14, S. 9–11.
57. Page, R. C.; Schroeder, H. E. (1976): Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 34 (3), S. 235–249.
58. PAGE, R. C.O.Y.; KORNMAN, KENNETH S. (1997): The pathogenesis of human periodontitis. An introduction. In: *Periodontol 2000* 14 (1), S. 9–11. DOI: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00189.x.
59. Peedikayil, Faizal C.; Sreenivasan, Prathima; Narayanan, Arun (2015): Effect of coconut oil in plaque related gingivitis - A preliminary report. In: *Nigerian medical journal : journal of the Nigeria Medical Association* 56 (2), S. 143–147. DOI: 10.4103/0300-1652.153406.
60. Pozhitkov, Alex E.; Leroux, Brian G.; Randolph, Timothy W.; Beikler, Thomas; Flemmig, Thomas F.; Noble, Peter A. (2015): Towards microbiome transplant as a therapy for periodontitis: an exploratory study of periodontitis microbial signature contrasted by oral health, caries and edentulism. In: *BMC oral health* 15, S. 125. DOI: 10.1186/s12903-015-0109-4.

61. Price, Morgan N.; Dehal, Paramvir S.; Arkin, Adam P. (2010): FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. In: *PLoS one* 5 (3), e9490. DOI: 10.1371/journal.pone.0009490.
62. Pride, David T.; Salzman, Julia; Haynes, Matthew; Rohwer, Forest; Davis-Long, Clara; White, Richard A. 3rd *et al.* (2012): Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. In: *The ISME journal* 6 (5), S. 915–926. DOI: 10.1038/ismej.2011.169.
63. Qin, Jie; Chai, Geging; Brewer, John M.; Lovelace, Leslie L.; Lebioda, Lukasz (2006): Fluoride inhibition of enolase: crystal structure and thermodynamics. In: *Biochemistry* 45 (3), S. 793–800. DOI: 10.1021/bi051558s.
64. Quinque, Dominique; Kittler, Ralf; Kayser, Manfred; Stoneking, Mark; Nasidze, Ivan (2006): Evaluation of saliva as a source of human DNA for population and association studies. In: *Analytical biochemistry* 353 (2), S. 272–277. DOI: 10.1016/j.ab.2006.03.021.
65. Salazar, Christian R.; Sun, Jinghua; Li, Yihong; Francois, Fritz; Corby, Patricia; Perez-Perez, Guillermo *et al.* (2013): Association between selected oral pathogens and gastric precancerous lesions. In: *PLoS one* 8 (1), e51604. DOI: 10.1371/journal.pone.0051604.
66. Saravanan D *et al* (2013): Effect of Oil Pulling with Sesame Oil on Plaque-induced Gingivitis: A Microbiological Study. In: *10.5005/jp-journals-10026*, S. 175–180.
67. Schlagenhauf, Ulrich; Jakob, Lena; Eigenthaler, Martin; Segerer, Sabine; Jockel-Schneider, Yvonne; Rehn, Monika (2016): Regular consumption of Lactobacillus reuteri-containing lozenges reduces pregnancy gingivitis: an RCT. In: *Journal of clinical periodontology* 43 (11), S. 948–954. DOI: 10.1111/jcpe.12606.
68. Schroder, Stine A.; Bardow, Allan; Eickhardt-Dalboge, Steffen; Johansen, Helle K.; Homoe, Preben (2017): Is parotid saliva sterile on entry to the oral cavity? In: *Acta oto-laryngologica*, S. 1–6. DOI: 10.1080/00016489.2016.1272002.
69. Segata, Nicola; Haake, Susan Kinder; Mannon, Peter; Lemon, Katherine P.; Waldron, Levi; Gevers, Dirk *et al.* (2012a): Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. In: *Genome biology* 13 (6), R42. DOI: 10.1186/gb-2012-13-6-r42.
70. Segata, Nicola; Waldron, Levi; Ballarini, Annalisa; Narasimhan, Vagheesh; Jousson, Olivier; Huttenhower, Curtis (2012b): Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. In: *Nature methods* 9 (8), S. 811–814. DOI: 10.1038/nmeth.2066.
71. Sender, Ron; Fuchs, Shai; Milo, Ron (2016): Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. In: *Cell* 164 (3), S. 337–340. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.013.
72. Shanbhag, Vagish Kumar L. (2017): Oil pulling for maintaining oral hygiene - A review. In: *Journal of traditional and complementary medicine* 7 (1), S. 106–109. DOI: 10.1016/j.jtcme.2016.05.004.
73. Sheikh, Faisal S.; Iyer, Ramya R. (2016): The effect of oil pulling with rice bran oil, sesame oil, and chlorhexidine mouth rinsing on halitosis among pregnant women: A comparative interventional study. In: *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research* 27 (5), S. 508–512. DOI: 10.4103/0970-9290.195638.
74. Singla, Nishu; Acharya, Shashidhar; Martena, Suganthi; Singla, Ritesh (2014): Effect of oil gum massage therapy on common pathogenic oral microorganisms - A randomized controlled trial. In: *Journal of Indian Society of Periodontology* 18 (4), S. 441–446. DOI: 10.4103/0972-124X.138681.
75. Sood, Poonam; Devi M, Aruna; Narang, Ridhi; V, Swathi; Makkar, Diljot Kaur (2014): Comparative efficacy of oil pulling and chlorhexidine on oral malodor: a randomized

- controlled trial. In: *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 8 (11), ZC18-21. DOI: 10.7860/JCDR/2014/9393.5112.
76. Spielman, A. I. (1990): Interaction of saliva and taste. In: *Journal of dental research* 69 (3), S. 838–843. DOI: 10.1177/00220345900690030101.
 77. Srivastava, Smita; Singh, Madhulika; George, Jasmine; Bhui, Kulpreet; Murari Saxena, Anand; Shukla, Yogeshwer (2010): Genotoxic and carcinogenic risks associated with the dietary consumption of repeatedly heated coconut oil. In: *The British journal of nutrition* 104 (9), S. 1343–1352. DOI: 10.1017/S0007114510002229.
 78. Sroisiri Theweeboon et al. (2011): Effect of Oil-Pulling on oral Microorganisms in Biofilm Models. In: *Asia Journal of Public Health* Vol.2 (No.2), S. 62–66.
 79. Sullivan, Åsa; Edlund, Charlotta; Nord, Carl Erik (2001): Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. In: *The Lancet Infectious Diseases* 1 (2), S. 101–114. DOI: 10.1016/S1473-3099(01)00066-4.
 80. Suzuki, Nao; Nakano, Yoshio; Yoshida, Akihiro; Yamashita, Yoshihisa; Kiyoura, Yusuke (2004): Real-time TaqMan PCR for quantifying oral bacteria during biofilm formation. In: *Journal of clinical microbiology* 42 (8), S. 3827–3830. DOI: 10.1128/JCM.42.8.3827-3830.2004.
 81. Teughels, Wim; Durukan, Andac; Ozcelik, Onur; Pauwels, Martine; Quirynen, Marc; Haytac, Mehmet Cenk (2013): Clinical and microbiological effects of Lactobacillus reuteri probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. In: *Journal of clinical periodontology* 40 (11), S. 1025–1035. DOI: 10.1111/jcpe.12155.
 82. Vazquez-Baeza, Yoshiki; Pirrung, Meg; Gonzalez, Antonio; Knight, Rob (2013): EMPoror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. In: *GigaScience* 2 (1), S. 16. DOI: 10.1186/2047-217X-2-16.
 83. Vicario, Monica; Santos, Antonio; Violant, Deborah; Nart, Jose; Giner, Lluís (2013): Clinical changes in periodontal subjects with the probiotic Lactobacillus reuteri Prodentis: a preliminary randomized clinical trial. In: *Acta odontologica Scandinavica* 71 (3-4), S. 813–819. DOI: 10.3109/00016357.2012.734404.
 84. Vollaard, E. J.; Clasener, H. A. (1994): Colonization resistance. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 38 (3), S. 409–414.
 85. Welsch, Ulrich; Deller, Thomas (2010): Lehrbuch Histologie. 3. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer. Online verfügbar unter <http://institut.elsevierlibrary.de/product/sobotta-lehrbuch-histologie14485#.UrLi1Pg5Vo>.
 86. Yarza, Pablo; Yilmaz, Pelin; Pruesse, Elmar; Glockner, Frank Oliver; Ludwig, Wolfgang; Schleifer, Karl-Heinz et al. (2014): Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. In: *Nature reviews. Microbiology* 12 (9), S. 635–645. DOI: 10.1038/nrmicro3330.
 87. Zipfel, E.; Grezes, J.-R.; Seiffert, W.; Zimmermann, H. W. (1981): Romanowsky-Färbstoffe und den Romanowsky-Giemsa-Effekt. In: *Histochemistry* 72 (2), S. 279–290. DOI: 10.1007/BF00517141.

11 Publikationsverzeichnis

Die aus dieser Dissertation resultierende Veröffentlichung wurde im wissenschaftlichen Journal *Clinical oral investigations* eingereicht und steht derzeit unter dem Status „Review“.

12 Anhang

Tabelle 13: Tabelle zur Berechnung der Speichelmenge und CFU

Proband A		Speichel	Volumen [ml] rückgeführte Ziehschubstanz	Probe	CFU /		
					ml Probe	Proben- volumen	ml Speichel Speichel- volumen
NaCl	Ziehtag 1	vorher	4,5	4,5	2,1E+08	9,5E+08	2,1E+08
		ziehen	4,3	15,7	2,0E+07	4,0E+08	9,3E+07
		nachher	3,0		4,1E+08	1,2E+09	4,1E+08
	Ziehtag 2	vorher	5,0	5,0	2,2E+08	1,1E+09	2,2E+08
		ziehen	4,0	14,5	1,5E+07	2,8E+08	6,9E+07
		nachher	2,7		1,0E+08	2,7E+08	1,0E+08
	Ziehtag 3	vorher	4,5	4,5	2,0E+08	9,0E+08	2,0E+08
		ziehen	3,5	15,5	1,3E+07	2,5E+08	7,1E+07
		nachher	3,0		5,1E+08	1,5E+09	5,1E+08
	Ziehtag 1	vorher	4,9	4,9	2,9E+08	1,4E+09	2,9E+08
		ziehen	7,0	15,0	3,3E+07	7,3E+08	1,0E+08
		nachher	3,1		2,8E+08	8,7E+08	2,8E+08
Öl	Ziehtag 1	vorher	3,0	3,0	4,5E+08	1,4E+09	4,5E+08
		ziehen	2,2	15,3	3,5E+07	6,1E+08	2,8E+08
		nachher	2,3		3,3E+08	7,6E+08	3,3E+08
	Ziehtag 2	vorher	3,9	3,9	1,4E+09	5,5E+09	1,4E+09
		ziehen	4,3	14,7	2,5E+08	4,8E+08	1,1E+09
		nachher	2,9		1,1E+08	3,2E+08	1,1E+08
Proband B	NaCl	vorher	2,3	2,3	2,6E+08	6,0E+08	2,6E+08
		ziehen	5,0	15,0	3,0E+07	6,0E+08	1,2E+08
		nachher	2,1		2,4E+08	5,0E+08	2,4E+08
	Ziehtag 2	vorher	2,0	2,0	8,1E+08	1,6E+09	8,1E+08
		ziehen	5,5	15,0	6,7E+07	1,4E+09	2,5E+08
		nachher	3,0		2,1E+08	6,3E+08	2,1E+08
	Ziehtag 3	vorher	2,3	2,3	2,3E+08	5,3E+08	2,3E+08
		ziehen	4,6	15,4	2,8E+07	5,6E+08	1,2E+08
		nachher	2,8		3,4E+08	9,5E+08	3,4E+08
	Öl	vorher	2,9	2,9	6,0E+08	1,7E+09	6,0E+08
		ziehen	8,1	14,9	1,7E+08	3,9E+09	4,8E+08
		nachher	2,9		8,0E+07	2,3E+08	8,0E+07
	Ziehtag 2	vorher	2,8	2,8	6,0E+08	1,7E+09	6,0E+08
		ziehen	7,1	14,9	2,5E+08	5,5E+09	7,7E+08
		nachher	3,1		8,9E+07	2,8E+08	8,9E+07
	Ziehtag 3	vorher	2,4	2,4	4,3E+08	1,0E+09	4,3E+08
		ziehen	6,1	14,9	4,6E+07	9,7E+08	1,6E+08
		nachher	2,3		1,6E+08	3,7E+08	1,6E+08
Proband C	NaCl	vorher	4,1	4,1	2,2E+08	9,0E+08	2,2E+08
		ziehen	4,1	14,9	2,0E+07	3,8E+08	9,3E+07
		nachher	3,4		1,6E+08	5,4E+08	1,6E+08
	Ziehtag 2	vorher	3,5	3,5	1,4E+08	4,9E+08	1,4E+08
		ziehen	4,0	15,0	1,1E+07	2,1E+08	5,2E+07
		nachher	3,1		1,4E+08	4,3E+08	1,4E+08
	Ziehtag 3	vorher	4,2	4,2	2,4E+08	1,0E+09	2,4E+08
		ziehen	3,3	15,7	1,9E+07	2,8E+08	1,6E+08
		nachher	4,0		1,8E+08	7,2E+08	1,8E+08
	Öl	vorher	3,5	3,5	8,2E+08	2,9E+09	8,2E+08
		ziehen	8,4	15,1	4,5E+06	1,1E+08	1,3E+07
		nachher	4,1		2,0E+08	8,2E+08	2,0E+08
	Ziehtag 2	vorher	4,9	4,9	4,9E+08	2,1E+09	4,3E+08
		ziehen	6,5	15,0	3,3E+07	7,1E+08	1,1E+08
		nachher	4,8		1,1E+08	5,3E+08	1,1E+08
	Ziehtag 3	vorher	4,4	4,4	6,4E+08	2,8E+09	6,4E+08
		ziehen	6,7	14,8	8,5E+07	1,8E+09	2,7E+08
		nachher	5,4		4,5E+07	2,4E+08	4,5E+07

Tabelle 14: Tabelle zur Berechnung der Speichelmenge und Reads

100

Tabelle 15: Zusammenfassung der Bakterien nach Gattung, alphabetisch, Anteile im Speichel, Proband: A,B,C, Ergebnisse des NGS

Gattung	% Anteil im Speichel			Gattung	% Anteil im Speichel		
	Proband A	Proband B	Proband C		Proband A	Proband B	Proband C
<i>Acinetobacter</i>	-	0.0002	0.0003	<i>Listeria</i>	0.0002	0.0012	0.0008
<i>Actinobacillus</i>	0.4555	0.3082	0.5673	<i>Lysinibacillus</i>	-	0.0002	-
<i>Actinomyces</i>	2.4590	4.7042	3.2081	<i>Megasphaera</i>	2.0961	0.4093	0.3995
<i>Aerococcus</i>	0.1050	0.0002	0.0003	<i>Mobiluncus</i>	-	0.0249	0.0620
<i>Aggregatibacter</i>	0.1753	0.1427	0.2611	<i>Mogibacterium</i>	0.3825	0.3154	0.1561
<i>Agrobacterium</i>	0.0004	0.0005	0.0005	<i>Mollicutes</i> RF39	0.0647	0.0407	0.0479
<i>Akkermansia</i>	0.0002	0.0002	0.0003	<i>Moraxella</i>	0.0004	-	0.0008
<i>Atopobium</i>	1.9965	0.9902	1.1808	<i>Moryella</i>	0.1146	0.0005	0.1020
<i>Bacillus</i>	-	0.0002	-	<i>Mycoplasma</i>	0.0011	0.0002	0.0022
<i>Bacteroidales</i> S24-7	0.0054	0.0035	0.0044	<i>Neisseria</i>	4.5475	8.6061	12.9174
<i>Bacteroides</i>	0.0018	0.0026	0.0016	<i>Oribacterium</i>	0.2185	0.3268	0.5453
<i>Bifidobacterium</i>	0.0040	-	0.0321	<i>Oscillospira</i>	0.0007	0.0007	0.0011
<i>Bulleidia</i>	0.4242	0.4873	0.6032	<i>Oxalobacter</i>	0.0002	0.0002	-
<i>Butyrivibrio</i>	-	0.0316	0.0617	<i>Paludibacter</i>	0.0992	0.0014	0.0011
<i>Campylobacter</i>	0.7986	0.9012	1.3790	<i>Parabacteroides</i>	-	0.0002	-
<i>Candidatus Absconditabacteria</i>	0.0098	0.0030	0.2660	<i>Paracoccus</i>	-	0.0005	-
<i>Candidatus Gracilibacteria</i> BD1-5	0.0154	0.0012	0.0008	<i>Parvimonas</i>	0.0271	0.1371	0.0057
<i>Candidatus Saccharibacteria</i> F16	0.2995	0.2656	0.4631	<i>Peptococcus</i>	-	0.0009	-
<i>Capnocytophaga</i>	0.3136	0.6781	0.7960	<i>Peptostreptococcus</i>	0.3143	1.2703	0.2208
<i>Cardiobacterium</i>	0.0139	0.0139	0.0041	<i>Porphyromonas</i>	4.9405	2.6363	1.6257
<i>Catonella</i>	0.1260	0.2022	0.1381	<i>Prevotella</i>	28.5108	23.7212	28.6407
<i>Coprococcus</i>	0.0004	-	-	<i>Propionibacterium</i>	0.0011	-	0.0003
<i>Corynebacterium</i>	0.0911	0.0493	0.0286	<i>Propionivibrio</i>	0.0002	-	-
<i>Dehalobacterium</i>	0.0002	-	-	<i>Pseudomonas</i>	0.0004	0.0007	0.0014
<i>Delftia</i>	0.0004	0.0007	0.0011	<i>Pseudoramibacter</i>	0.0004	-	0.0011
<i>Desulfobulbus</i>	0.0004	-	-	<i>Ralstonia</i>	0.0002	-	-
<i>Desulfovibrio</i>	0.0002	-	0.0003	<i>Rikenella</i>	0.0018	0.0009	0.0003
<i>Dethiosulfovibrionaceae</i> TG5	0.0092	-	-	<i>Rothia</i>	2.2709	3.9489	4.1385
<i>Dialister</i>	0.0470	0.0149	0.0103	<i>Ruminococcus</i>	0.0009	0.0002	0.0003
<i>Eikenella</i>	0.0004	0.0019	0.0022	<i>Scardovia</i>	0.0045	0.0016	0.0024
<i>Enterococcus</i>	0.1394	0.2259	0.2012	<i>Schwartzia</i>	0.0051	-	0.0008
<i>Escherichia</i>	0.0002	0.0002	0.0008	<i>Selenomonas</i>	0.1298	0.2466	0.6986
<i>Eubacterium</i>	0.0002	-	-	<i>Slackia</i>	0.0170	0.0012	0.0003
<i>Filifactor</i>	-	0.0007	0.0005	<i>Staphylococcus</i>	0.0058	0.0044	0.0005
<i>Fusobacterium</i>	6.0281	3.7349	2.8685	<i>Streptococcus</i>	18.6900	20.8486	17.5940
<i>Gemella</i>	4.3812	3.6017	2.3314	<i>Streptophyta</i>	-	-	0.0003
<i>Granulicatella</i>	0.0222	0.0425	0.0373	<i>Sutterella</i>	0.0002	-	-
<i>Haemophilus</i>	4.7774	6.5329	6.1481	<i>Tannerella</i>	0.5797	0.1848	0.1634
<i>Kingella</i>	0.0508	0.0600	0.1150	<i>Treponema</i>	0.0298	0.0112	0.0416
<i>Lachnospira</i>	0.4340	0.4620	0.1640	<i>Vagococcus</i>	0.0049	0.0098	0.0041
<i>Lactobacillus</i>	0.0022	0.0009	0.0098	<i>Veillonella</i>	9.3103	11.6926	8.8377
<i>Lautropia</i>	0.0537	0.0056	0.0258	<i>Weeksella</i>	0.1222	0.1274	0.7362
<i>Leptotrichia</i>	4.2630	1.9563	2.1356				

Einverständniserklärung

zur kulturellen und molekularen Analyse der Oralmikrobiota aus der Ölziehkur
[Bakterien in Mundspüllösungen von Öl, NaCl (0,9 %) und Speichel] sowie
Aufbewahrung des Untersuchungsmaterials und Publikation der Ergebnisse.

Name:

Vorname:

Geburtsdatum:

Ich erkläre mich einverstanden, dass aus dem von mir abgegebenen Material der Ölziehkur [Öl, NaCl (0,9 %), Speichel] die Gesamt-DNA/RNA isoliert und die individuelle Zusammensetzung der Oralmikrobiota (Bakterien im Mund) kulturell und molekularbiologisch analysiert wird. Ich stimme außerdem zu, dass das Restmaterial der Proben im Institut für Medizinische Mikrobiologie in Gießen aufbewahrt wird, um die entsprechenden Ergebnisse überprüfen zu können. Nach Abschluss des Projektes werden die Proben vernichtet. Ich bin ebenfalls einverstanden, dass das Material bzw. die daraus gewonnenen Daten anonymisiert für rein wissenschaftliche Zwecke verwendet werden und die Ergebnisse veröffentlicht werden dürfen.

Die Proben werden ausschließlich für diesen Zweck verwendet. Weitere Untersuchungen sind nur nach einer erneuten Zustimmung zulässig.

Diese Einwilligungserklärung erfolgt freiwillig und kann jederzeit widerrufen werden. Bei Widerruf wird das Untersuchungsmaterial vernichtet.

Ort/Datum: _____

Unterschrift (Studienteilnehmer): _____

Ort/Datum: _____

Unterschrift (verantwortlicher Projektleiter): _____

13 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

14 Danksagung

Danken möchte ich an erster Stelle meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Eugen Domann, der trotz seiner institutionellen und wissenschaftlichen Pflichten sprichwörtlich stets eine offene Tür für mich hatte. Er hat die Dissertation, deren Ergebnisse sowie die dazugehörige Veröffentlichung mit Nachdruck und großer Leidenschaft vorangetrieben. Die Bereitstellung der nicht unerheblichen finanziellen Mittel, Materialien, Anlagen und persönlichen Proben war für mich ein Privileg, welches ich ausdrücklich wertschätzen möchte.

Insbesondere danke ich auch Herrn Prof. Dr. Trinad Chakraborty und den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der JLU Gießen für ihre Anregungen, Unterstützung und Bereitstellung von technischen Anlagen außerhalb unserer eigenen Arbeitsgruppe.

Ein besonderer Dank gilt Silke Zechel-Gran, die als technische Assistentin in besonderer Weise durch Ihre große Kompetenz und Interesse starken Einfluss auf die Planung und Durchführung dieser Dissertation hatte. Ihr kam immer eine Idee, wenn mal ein Versuch unerwarteterweise nicht funktionierte und überprüfte systematisch wichtige Weichenstellungen bei der aufwendigen Sequenzierarbeit.

Für die statistische Aufarbeitung und Analyse der enormen produzierten Datenmenge danke ich PD Dr. Torsten Hain, Stefan Olejniczak und Markus Weigel. Die Verarbeitung eines einzigen Sequenzierlaufes hätte ohne dieses informatische „Know-how“ sicher viele Monate in Anspruch genommen.

Ein persönlicher Dank gilt Miriam Kaese, die nicht nur als Proband in dieser Arbeit mitwirkte, sondern auch eine große Stütze in dieser Zeit für mich war. Mein familiärer Dank gilt meinen Eltern Helmut und Evelyn, die Studium und Dissertation finanziell und mental voll mitgetragen haben. Ohne diesen Rückhalt wäre dies Alles nicht möglich gewesen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6722-9



9 17 8 3 8 3 5 1 9 6 7 2 2 9